



Biodétérioration des structures portuaires en acier : synergie entre la physico-chimie du fer en milieu marin et les micro-organismes sulfurogènes

Mikaël Langumier

► To cite this version:

Mikaël Langumier. Biodétérioration des structures portuaires en acier : synergie entre la physico-chimie du fer en milieu marin et les micro-organismes sulfurogènes. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2011. Français. NNT : 2011LAROS340 . tel-00717856

HAL Id: tel-00717856

<https://theses.hal.science/tel-00717856>

Submitted on 13 Jul 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITÉ DE LA
ROCHELLE



Laboratoire d'Études des Matériaux en Milieux Agressifs



ÉCOLE DOCTORALE Gay Lussac
Sciences pour l'environnement

Laboratoire d'Études des Matériaux en Milieux Agressifs (LEMMA)
Littoral Environnement et Société (LIENSs)

THÈSE

Présentée par :

Mikaël LANGUMIER

Soutenue le 4 Novembre 2011
pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Microbiologie

**Biodétérioration des structures portuaires en acier :
synergie entre la physico-chimie du fer en milieu marin et les
micro-organismes sulfurogènes.**

JURY :

Frédéric JORAND
Eliane SUTTER
Alain BERGEL
Samuel PINEAU
Philippe REFAIT
Sophie SABLE
René SABOT

Maître de Conférences (HDR), Université de Nancy
Professeur, Université Pierre et Marie Curie Paris
Directeur de recherche CNRS, Université de Toulouse
Docteur, Ingénieur, société ACCOAST
Professeur, Université de La Rochelle
Maître de Conférences (HDR), Université de La Rochelle
Maître de Conférences, Université de La Rochelle

Rapporteur
Rapporteur
Président
Examineur
Directeur de thèse
Directrice de thèse
Invité

Remerciements

Ce travail s'est déroulé au sein des laboratoires LEMMA (Laboratoire d'Etude des Matériaux en Milieux Agressifs EA 3167) et LIENSs (Littoral ENvironnement et Sociétés UMR6250 CNRS) de l'Université de La Rochelle. Ce projet a été financé par le conseil général de la Charente Maritime.

Je tiens à remercier en premier lieu M. Xavier Feaugas, Directeur du LEMMA, ainsi que M. Sylvain Lamare, Directeur adjoint de LIENSs, pour m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires respectifs.

Je remercie M. Philippe Refait pour son implication, sa grande qualité scientifique ainsi que ses qualités humaines. Merci d'avoir eu la patience nécessaire afin de m'amener à finaliser ce travail qui m'a semblé trop souvent insurmontable et de m'avoir toujours encouragé à aller de l'avant.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mme Sophie Sablé pour son expérience en matière de microbiologie, sa disponibilité ainsi que son soutien indéfectible. Merci d'avoir été là dans les moments difficiles.

Que Mme Isabelle Lanneluc, M. Marc Jeannin, M. René Sabot soient chaleureusement remerciés pour toutes les compétences qu'ils m'ont fait partager, leur patience et leur disponibilité.

Je tiens également à assurer Mme Valérie Sopena (mama crobio) de ma sincère amitié, merci d'avoir rendu le quotidien du laboratoire si agréable.

Merci à tous mes collègues doctorants qui m'ont accompagné durant ces années de labeur : mon pépito en premier lieu, mais aussi Manu, Pierre, Matthieu, Zsuzsa, Hélène, et tous les autres.

Enfin merci à ma famille qui m'aura toujours soutenu et sans qui rien n'aurait été possible, ainsi que mes amis de toujours, le Grand Quevilly Crew (Thom, Popo, Didi, Vanou) et tous les autres qui malgré mon absentéisme et mon mutisme ont su rester à mes côtés.

Du fond du cœur merci à tous.

SOMMAIRE

Introduction générale	1
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	4
I. L'environnement marin	4
I.1. L'eau de mer : composition et caractéristiques	4
I.2. Influence de l'eau de mer sur la corrosion	5
II. Processus de corrosion de l'acier en milieu marin	6
II.1. Réaction de corrosion	6
II.2. Corrosion généralisée	7
II.3. Corrosion localisée	8
II.3.1. Corrosion par pile d'aération	8
II.3.2. Corrosion caverneuse	9
II.3.3. Corrosion par piqûres	9
II.4. Produits de corrosion	9
II.4.1. Les oxydes de fer	10
II.4.2. Les oxyhydroxydes ferriques	11
II.4.3. Les rouilles vertes	12
II.4.4. Les sulfures de fer	13
II.4.5. Autres produits de corrosion	14
II.5. Organisation des produits de corrosion dans le cas d'aciers faiblement alliés immergés en eau de mer naturelle	15
III. Diversité des micro-organismes en environnement marin	18
III.1. La classification des micro-organismes	18
III.2. Les procaryotes en environnement marin	19
IV. Les micro-organismes impliqués dans la corrosion marine des aciers	21
IV.1. Notions de métabolisme bactérien	21
IV.2. La microflore liée au cycle du soufre	23

IV.2.1. Cycle biologique du soufre	23
IV.2.2. Bactéries sulfato-réductrices (BSR)	25
IV.2.3. Bactéries Thiosulfato-Réductrices (BTR)	26
IV.2.4. Bactéries sulfo-oxydantes (BSO)	27
IV.3. La microflore liée au cycle du fer	28
IV.3.1. Le cycle du fer	28
IV.3.2. Bactéries ferro-oxydantes (BFO)	30
IV.3.3. Bactéries ferri-réductrices (BFR)	31
IV.4. Le mode de vie « biofilm » des micro-organismes	32
V. Les principaux mécanismes de la corrosion bactérienne	34
VI. Conclusions	36
Chapitre 2 : Matériels et méthodes	50
I. Site d'expérimentation et matériel	50
I.1. Site d'expérimentation et installation des coupons	50
I.2. Coupons métalliques et électrodes de travail : composition et préparation	52
I.3. Milieux, conditions de culture et bactérie modèle	53
I.3.1. Milieux de culture	53
I.3.2. Bactérie de référence	56
II. Méthodes	57
II.1. Méthodes de prélèvement	57
II.2. Stades de prélèvements et répartition des échantillons	57
II.3. Extraction des micro-organismes	58
II.4. Synthèse de la rouille verte sulfatée, RV (SO_4^{2-})	58
II.5. Synthèse de couches de rouille modèle	59
II.6. Micro-spectroscopie RAMAN	61
II.6.1. Principe	61
II.6.2 Instrumentation et préparation des échantillons	63
II.7 Analyse par diffraction des rayons X	63
II.7.1 Principe	63
II.7.2. Instrumentation et préparation des échantillons	65
II.8. Microscopie électronique à balayage	65
II.8.1. Principe	65

II.8.2. Appareillage	66
II.9. Evaluation de la biomasse microbienne	67
II.9.1. Conditions de culture	67
II.9.2. Dénombrement des bactéries par croissance sur milieux gélosé	67
II.9.3. Dénombrement des bactéries par marquage au fluorochrome DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	67
II.10. Enrichissement de la flore bactérienne cultivable	68
II.11. Isolement de souches bactériennes cultivables	68
II.12. Caractérisation biochimique des souches bactériennes isolées	69
II.12.1. Coloration de Gram	69
II.12.2. Oxydase	69
II.12.3. Catalase	70
II.13. Extraction de l'ADN	70
II.13.1. Extraction de l'ADN génomique de souches pures	70
II.13.2. Extraction de l'ADN génomique d'échantillons de biofilm	70
II.13.3. Extraction de l'ADN génomique d'enrichissements	70
II.13.4. Contrôle de pureté et estimation de la concentration en ADN extrait	71
II.14. Séquençage de l'ADNr 16S des souches isolées	71
II.14.1. Choix des amorces	71
II.14.2. Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)	71
II.14.3. Séquençage	72
II.15. Analyse par Temperature Time Gel Electrophoresis (TTGE)	73
II.15.1. Principe	73
II.15.2. Choix des amorces	73
II.15.3. Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)	74
II.15.4. Conditions expérimentales de la TTGE	74
II.15.5. Analyse des gels de TTGE par densitométrie	75
II.15.6. Séquençage	75
Chapitre 3 : Interactions entre RV(SO₄²⁻) et la souche bactérienne <i>Desulvibrio desulfuricans</i> subsp. <i>aestuarii</i>	77
I. Évolution de la rouille verte sulfatée dans les milieux de culture abiotiques	78
II. Bioréduction de la rouille verte sulfatée en l'absence de CO₂ et d'autre sources de sulfates que RV(SO₄²⁻)	80
II.1. Conditions initiales	80
II.2. Suivi de la concentration bactérienne au cours du temps	81

II.3. Résultats physico-chimiques	83
II.3.1 Micro-spectroscopie Raman	83
II.3.2 Diffraction des rayons X	84
III. Bioréduction de la rouille verte sulfatée en atmosphère contenant du CO₂ et en présence de sulfates	86
III.1. Conditions initiales	86
III.2. Suivi de la concentration bactérienne au cours du temps	87
III.3. Résultats physico-chimiques	88
III.3.1. Micro-spectroscopie Raman	88
III.3.2. Diffraction des rayons X	91
IV. Discussion	91
IV.1. Méthodes d'analyses et détection des sulfures de fer	91
IV.2. Le système rouille verte sulfatée / bactéries sulfato-réductrices / mackinawite	92
IV.3. Bioréduction de la rouille verte sulfatée dans un environnement riche en sulfates et en présence de CO₂	94
V. Conclusion	95
Chapitre 4 : Évolution de la diversité bactérienne et des produits de corrosion présents sur des coupons d'acier au carbone après 7 jours à 2 mois d'immersion en milieu marin	98
I. Conditions initiales	98
II. Analyses des produits de corrosion du biofilm composite « micro-organismes / produits de corrosion »	99
II.1. Analyse après 7 jours d'immersion	99
II.2. Analyse après 15 jours d'immersion	100
II.3. Analyse après 1 mois d'immersion	102
II.4. Analyse après 2 mois d'immersion	103
II.5. Conclusion	104
III. Analyses microbiologiques et moléculaires de la couche composite « micro-organismes / produits de corrosion »	105

III.1. Abondance bactérienne	105
III.1.1. Estimation du nombre total de bactéries	105
III.1.2. Estimation du nombre de bactéries cultivables	106
III.1.3. Estimation de la fraction de bactéries cultivables	107
III.2. Diversité des bactéries cultivables isolées	108
III.2.1. Caractérisation morphologique et physiologique des bactéries cultivables	108
III.2.2. Identification des bactéries cultivables isolées	111
III.2.2.1. Analyse après 7 jours d'immersion	111
III.2.2.2. Analyse après 15 jours d'immersion	113
III.2.2.3. Analyse après 1 mois d'immersion	115
III.2.2.4. Analyse après 2 mois d'immersion	116
III.2.2.5. Conclusion	118
III.3. Diversité des bactéries cultivables des enrichissements	119
III.3.1. Identification	119
III.3.2. Comparaison par densitométrie	122
III.4. Diversité de la flore bactérienne totale	124
III.4.1. Identification	124
III.4.2. Comparaison par densitométrie	125
IV. Discussion	127
Chapitre 5 : Mécanismes de la corrosion marine des aciers en période anoxique	136
I. Polarisation anodique d'électrodes d'acier en milieux désaérés	137
I.1. Polarisation anodique dans l'eau de mer simplifiée désaérée	137
I.2. Rôle du rapport des concentrations en sulfate et carbonate	145
II. Analyses de la couche composite « rouille/micro-organismes » formée sur un coupon d'acier E24 après 11 ans d'immersion	149
II.1. Identification des produits de corrosion	150
II.2. Analyses microbiologiques et moléculaires de la couche composite « micro-organismes / produits de corrosion »	152
II.2.1. Abondance bactérienne	152
II.2.1.1. Estimation du nombre total de bactéries	152
II.2.1.2. Estimation du nombre de bactéries cultivables	153
II.2.1.3. Estimation de la fraction de bactéries cultivables	155
II.2.2. Diversité des bactéries cultivables isolées	155
II.2.2.1. Identification des bactéries cultivables isolées	155
II.2.2.2. Conclusion	159

II.2.3 Diversité de la flore bactérienne totale	160
III. Discussion	162
III.1. Thermodynamique	162
III.2. Mécanismes	163
Conclusions et perspectives	170
Annexe	177

Introduction générale

L'eau de mer couvre plus de 70% de la surface du globe. Elle contient de nombreux sels minéraux, des gaz dissous, notamment le dioxygène O_2 , des bactéries et d'autres organismes unis ou pluri-cellulaires, des matières en suspension et des sédiments qui parfois lui confèrent une grande turbidité. L'eau de mer n'est donc pas simplement une solution de chlorure de sodium. Ainsi, les ions sulfates arrivent, par ordre d'importance, après les ions Na^+ et Cl^- , et sont fortement impliqués dans les mécanismes associés à la corrosion marine des aciers. Les spécificités chimiques et biologiques de l'eau de mer en font un milieu particulièrement agressif vis à vis de nombreux matériaux et notamment des aciers peu ou moyennement alliés.

Les aciers non alliés sont largement utilisés dans la fabrication des infrastructures portuaires en milieu marin. Ces structures sont exposées à deux types de corrosion : la corrosion généralisée (ou uniforme) et la corrosion localisée (caverneuse ou par piquûre). Le plus généralement, les aciers subissent une corrosion généralisée. Sa cinétique est relativement connue, ce qui permet le dimensionnement des structures portuaires. Mais des cas de corrosion localisée accélérée conduisant à des dégradations catastrophiques ont été observés. Ils sont souvent associés au développement de micro-organismes particuliers, les bactéries sulfato-réductrices (BSR), dont le métabolisme conduit à une réduction des ions sulfates de l'eau de mer en espèces sulfures.

L'immersion en eau de mer d'un matériau conduit généralement, dans les heures qui suivent, à la formation d'un biofilm contenant des bactéries, des micro-algues et des détritiques, sur lequel viennent se fixer des macro-organismes, algues et invertébrés. Les micro-organismes peuvent jouer ainsi un rôle décisif dans la corrosion et les phénomènes correspondant sont alors désignés par le terme de « corrosion influencée ou induite par les micro-organismes (CIM) ». Ces phénomènes résultent d'interactions entre le milieu, le matériau, et les micro-organismes. Ils sont donc tributaires de paramètres propres à chacun des trois acteurs, notamment oxygénation, pH, température, quantité de matière organique en ce qui concerne le milieu, composition, microstructure, état de surface pour le matériau, et protéines extracellulaires, exopolysaccharides, interactions cellulaires au sein du biofilm, et métabolisme pour les micro-organismes.

Nos travaux de thèse s'inscrivent dans la droite ligne des dernières études effectuées dans le domaine de la CIM des aciers en milieu marin, et découlent notamment des résultats de la thèse de Samuel Pineau [1]. Cette dernière étude a nécessité le couplage d'analyses chimiques (MEB/EDS et ICP/AES), de caractérisation du solide par des sondes globales et locales (diffraction X et μ -spectroscopie Raman) ainsi que des techniques de biologie moléculaire. La détection du gène codant pour la sulfite-réductase dissimilatrice (*dsrAB*), une enzyme impliquée dans la réduction des sulfates, a été appliquée pour la première fois à une couche de produits de corrosion.

Dans la plupart des cas, la couche de produits de corrosion ne forme pas une barrière compacte isolant le métal du milieu. De par son importante porosité, elle constitue une zone particulière où les produits de la corrosion du fer vont coexister avec des espèces minérales solides ou dissoutes, des micro-organismes et des composés organiques issus de l'activité biologique. Le couplage de techniques physico-chimiques et microbiologiques a ainsi permis de démontrer que la couche de rouille formée sur un acier immergé en milieu marin, colonisée par une grande variété d'espèces bactériennes, constituait un écosystème particulier, différent du milieu environnant, et impliquant très vraisemblablement des interactions entre la physico-chimie du fer et les métabolismes bactériens. La corrosion électrochimique du fer en milieu marin conduit systématiquement [1,2] à l'hydroxysulfate Fe(II-III) de type rouille verte, ou RV(SO₄²⁻). Ce produit, qui constitue une source de sulfates, favorise probablement le développement des bactéries sulfato-réductrices dans la couche de rouille. Des travaux voués à l'étude des interactions RV(SO₄²⁻)/BSR ont permis de démontrer que les bactéries étaient effectivement capables d'utiliser les ions sulfates présents dans la structure de RV(SO₄²⁻) [3]. L'application des techniques de biologie moléculaire a permis de démontrer que les BSR étaient essentiellement détectées dans la partie interne de la couche, au même niveau que RV(SO₄²⁻) [2].

La corrosion des aciers en milieu marin implique donc différentes interactions entre les phénomènes d'oxydoréduction du fer et ceux du soufre via l'activité métabolique des micro-organismes. Le mécanisme général est donc, par essence même, un processus influencé par les bactéries. Il reste cependant uniforme et conduit à une dégradation généralisée du matériau. Certains cas de corrosion accélérée seraient donc imputables à une dérive locale du système « rouille-biofilm » vers des conditions extrêmes préjudiciables au matériau sous-jacent.

Le principal objectif de notre thèse était donc d'améliorer la compréhension des interactions entre la physico-chimie du fer et les métabolismes bactériens existant au sein du

système « rouille-biofilm » pour en déduire leur impact potentiel sur les processus de corrosion de l'acier. Pour ce faire, nous avons dans la première partie de notre travail étudié de façon détaillée les interactions entre BSR et $RV(SO_4^{2-})$, à l'instar de la première (et unique) étude réalisée à ce sujet [3]. Pour la nouvelle étude présentée ici, nous avons souhaité travailler dans des conditions différentes, notamment avec $RV(SO_4^{2-})$ comme unique solide à base de fer présent et avec une espèce bactérienne ne réalisant pas une oxydation complète du substrat carboné jusqu'au CO_2 . D'autre part, nous avons fait varier la concentration en bactéries afin de nous rapprocher des conditions réelles de corrosion marine. Pour étudier les interactions rouille verte sulfatée / BSR, nous avons mis en contact le solide synthétisé en laboratoire et la souche *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *aestuarii* pendant une durée de 30 jours dans différentes conditions. Les résultats sont développés dans le chapitre 3.

Nous avons parallèlement placé des coupons d'acier en immersion constante sur la plate-forme expérimentale dont dispose le LEMMA sur le site du port des Minimes de La Rochelle. L'objectif était de caractériser aux temps courts (1 semaine à 2 mois) le développement de la couche « rouille-biofilm » en couplant analyses physico-chimiques et microbiologiques. L'utilisation des techniques de biologie moléculaire pour un tel système, initiée par S. Pineau, a été reprise ici. Les résultats obtenus font l'objet du chapitre 4. Signalons que les travaux de S. Pineau sont relatifs à des durées d'immersion de 6 à 12 mois.

A l'inverse, la dernière partie a trait au comportement du système lorsque la surface de l'acier et les strates internes de la couche « rouille-biofilm » se retrouvent placées en conditions anoxiques, ce qui correspond à des durées d'immersion supérieures à 1 an. Nous avons d'une part caractérisé des coupons immergés continûment dans l'eau de mer pendant 11 ans en utilisant la même méthodologie qu'au chapitre 4. D'autre part, nous avons mené à bien une étude électrochimique du comportement d'électrodes d'acier dans des électrolytes désaérés simulant l'eau de mer. Ces expériences sont décrites dans le chapitre 5.

L'ensemble de ces résultats nous donne un aperçu général de l'évolution du système fer/soufre/milieu marin/bactéries depuis l'immersion de l'acier dans l'eau de mer jusqu'à la constitution après une dizaine d'années, d'une couche « rouille-biofilm » épaisse de près d'un centimètre. Les principaux résultats et les perspectives qu'ils ouvrent sont développés à la fin du manuscrit.

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

I. L'environnement marin

I.1. L'eau de mer : composition et caractéristiques

L'eau de mer est un milieu à la fois propice au développement biologique, de par sa composition riche en éléments nutritifs ainsi qu'à son effet tampon, et favorable aux phénomènes de corrosion en raison de la présence d'oxygène dissous et de sels minéraux. Elle est constituée à 96,5 % d'eau pure et à 3,5 % de composés dissous [4]. Ceux-ci sont classés en éléments majeurs, décrits dans le tableau 1.1, et en éléments mineurs, de concentrations beaucoup plus faibles [5].

Elément	Cl ⁻	Na ⁺	SO ₄ ²⁻	Mg ²⁺	Ca ²⁺	K ⁺	HCO ₃ ⁻	Br ⁻	H ₃ BO ₃	Sr ²⁺	F ⁻
Conc. en mg/kg	19353	10763	2712	1294	412	399	142	67	25,6	7,9	1,3

Tableau 1.1 : Concentration moyenne en sels dissous, en mg/kg, de l'eau de mer naturelle. Seuls les éléments dits « majeurs » sont considérés.

Les éléments mineurs ne représentent que 0,2 à 0,3 % en masse de la composition globale de l'eau de mer. Cependant, ils se révèlent d'une importance déterminante puisqu'ils comprennent des éléments minéraux et des composés azotés ou phosphorés qui sont indispensables au développement des espèces biologiques.

Le pH de l'eau de mer est en général compris entre 7,5 et 8,5. Il varie en fonction du système gaz carbonique / bicarbonate / carbonate mais est aussi relié à la concentration en oxygène dissous [6]. La concentration en oxygène dissous est un paramètre fondamental en milieu marin car une majorité des processus électrochimiques et biologiques en sont fortement tributaires. Cette concentration est essentiellement régulée par les échanges à l'interface air / eau, par la diffusion et par l'activité biologique.

I.2 Influence de l'eau de mer sur la corrosion

La corrosion résulte fondamentalement de l'interaction entre un matériau et le milieu dans lequel il se trouve, interaction pouvant être influencée par des conditions particulières (figure 1.1). Les paramètres influençant la corrosion peuvent être organisés en trois grandes catégories : chimiques, physiques ou biologiques. Les facteurs chimiques sont les gaz dissous (principalement l'oxygène et le dioxyde de carbone), la salinité, le pH et les carbonates dissous. L'oxygène est un élément clé de la corrosion des métaux. En milieu marin sa concentration varie en fonction de la profondeur, depuis sa teneur naturelle dans l'atmosphère (saturation) jusqu'à une concentration quasi nulle dans les zones sédimentaires. Cette différence de concentration crée des zones d'aération différentielle aux interfaces, ce qui accélère localement la corrosion du métal [7]. La composante physique concerne les conditions hydrodynamiques telles que les marées ou l'agitation. Enfin, les micro-organismes peuvent avoir un effet direct via la colonisation des surfaces et la production d'un biofilm (favorable ou réduisant la corrosion) ou via une interaction avec les autres facteurs (consommation et/ou production d'oxygène ou de dioxyde de carbone). En règle générale, la modification d'un paramètre en affecte d'autres du fait de nombreuses interactions.

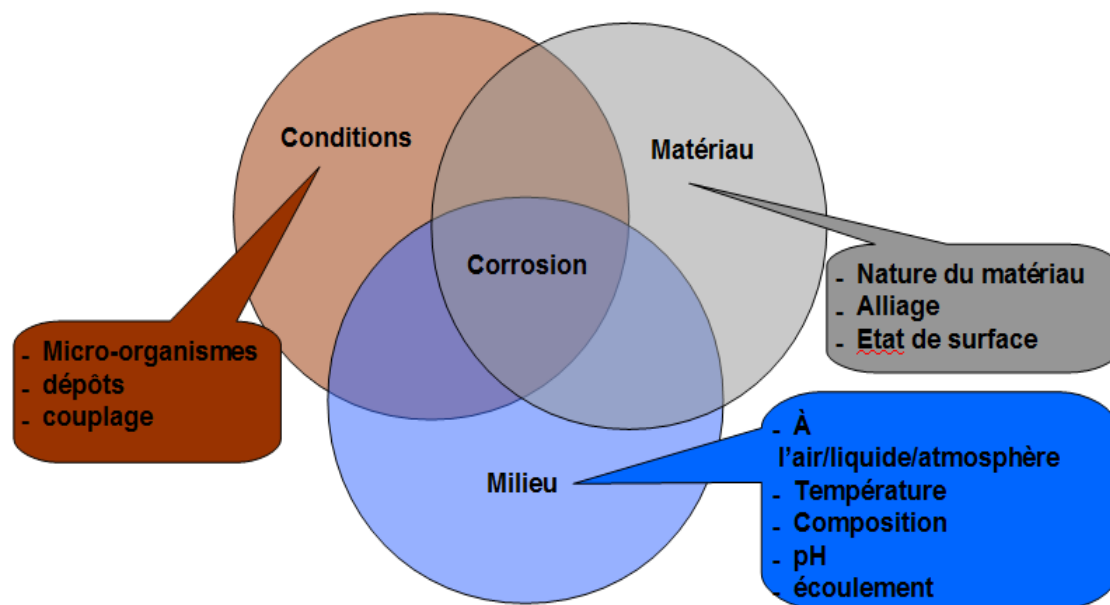


Figure 1.1 : Principaux facteurs influençant la corrosion, liés au milieu, au matériau et à des conditions particulières.

II. Processus de corrosion de l'acier en milieu marin

II.1. Réaction de corrosion

La corrosion est définie par la norme ISO 8044 : 1999 comme étant « l'interaction physico-chimique entre un métal et son milieu environnant entraînant des modifications dans les propriétés du métal et souvent une dégradation fonctionnelle du métal lui-même, de son environnement ou du système technique constitué par les deux facteurs. »

La corrosion des métaux en milieu aqueux est le plus souvent un phénomène électrochimique basé sur deux réactions :

- une réaction anodique d'oxydation du métal M :



- une réaction cathodique de réduction d'un agent oxydant présent dans le milieu, oxygène dissous en milieu aéré, eau (H_2O ou H^+) en milieu désaéré



La réaction anodique correspond à une production d'ions métalliques qui participent à la formation de composés solides, les produits de corrosion. Si de tels produits, oxydes, hydroxydes ou sels métalliques, précipitent à la surface du matériau, les réactions d'oxydation et de réduction sont ralenties. La corrosion est alors contrôlée par le plus lent des deux mécanismes :

- transport des ions métalliques du métal vers la solution à travers les produits de corrosion et
- apport en oxygène dissous de la solution jusqu'à l'interface métallique à travers les produits de corrosion.

La corrosion des aciers au carbone en milieu marin peut prendre deux formes : la corrosion uniforme (ou généralisée) et la corrosion localisée. Lors d'une corrosion généralisée, les réactions d'oxydation du métal et de réduction de l'oxygène (ou de l'hydrogène) sont réparties de manière uniforme sur la surface. La corrosion est localisée lorsque les réactions anodique et cathodique se produisent en des zones distinctes, avec une réaction anodique ayant lieu en une zone particulière de faible étendue.

II.2. Corrosion généralisée

La corrosion généralisée est le phénomène le plus fréquent mais le moins dangereux car facilement détectable et prévisible. Des vitesses de corrosion moyennes peuvent être définies et des modèles prédictifs plus ou moins détaillés sont développés. En ce qui concerne la corrosion marine des aciers, le modèle le plus récent et le plus abouti est un modèle phénoménologique proposé par l'équipe australienne de R.E. Melchers [8-11]. Ce modèle prend en compte 5 périodes temporelles, mais se subdivise essentiellement en deux principales périodes. Au cours de la première période, dite « aérée », la cinétique de la corrosion est contrôlée par la diffusion de l'oxygène. Les auteurs se sont notamment attachés à évaluer les effets de la température sur les paramètres définissant la vitesse de corrosion [9]. Au cours de la seconde période, dite « anaérobie », la cinétique est liée à l'activité bactérienne et par conséquent principalement contrôlée par la concentration en nutriments [11].

Il est à noter que la vitesse de corrosion généralisée varie selon la zone d'exposition considérée. La figure 1.2 présente le profil de la vitesse de corrosion d'une palplanche en fonction de la hauteur. Ce profil communément admis montre que la vitesse de corrosion est maximale dans la zone des basses-eaux et dans la zone des éclaboussures. La zone des éclaboussures correspond à la zone située immédiatement au-dessus des marées les plus hautes. Pour un matériau non passivable tel qu'un acier au carbone la vitesse de corrosion est élevée car le métal est en contact avec une eau de mer riche en oxygène. Le second maximum observé en dessous de la ligne des plus basses eaux est discuté plus loin. Pour information, la zone de marnage est comprise entre les niveaux de l'eau à marée basse et à marée haute aux plus forts coefficients. La zone des sédiments correspond aux parties enfouies. Enfin, la zone immergée est constituée par la mer à proprement parler. La corrosivité y dépend essentiellement des caractéristiques de l'eau et c'est à cette zone que nous nous intéresserons dans notre travail.

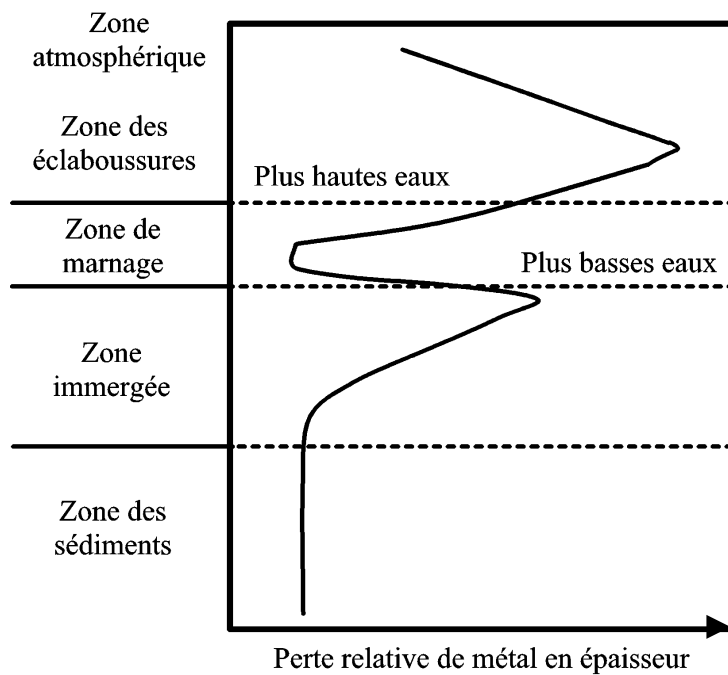


Figure 1.2 : Variation de la vitesse de corrosion de palplanches en acier au carbone en fonction de la zone d'exposition [9].

II.3. Corrosion localisée

La corrosion localisée peut être initiée par divers facteurs, mais une hétérogénéité à la surface du métal est toujours présente, qu'elle soit due à un défaut métallurgique, à un état de surface ou à une modification électrochimique. La zone concernée constitue une anode tandis que le reste de la surface fonctionne comme cathode. La dissolution locale du métal est accélérée car la densité de courant de corrosion est proportionnelle au rapport des surfaces cathodique et anodique S_k/S_a . Ainsi, plus la surface anodique est petite par rapport à la surface cathodique, plus la densité de courant de corrosion est élevée.

Divers types de corrosion localisée existent, leur dénomination faisant référence à leur origine ou leur aspect.

II.3.1. Corrosion par pile d'aération différentielle

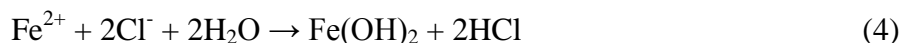
Cette réaction intervient lorsqu'un gradient de concentration d'oxygène intervient sur une surface du métal. La zone possédant la plus faible concentration en oxygène joue le rôle d'anode pendant que celle de plus forte concentration constitue la cathode. L'oxygène est alors réduit au niveau de la cathode tandis que le métal s'oxyde à l'anode.

Un exemple typique est la corrosion en basses eaux, un phénomène qui engendre des vitesses de corrosion importantes, notamment pour les rideaux de palplanches (cf figure 1.2).

Le phénomène est imputable à une aération différentielle entre la zone de marnage, qui va avoir un comportement cathodique, et la zone d'environ 1 m de hauteur sous la ligne des basses eaux, qui va jouer le rôle d'anode.

II.3.2. Corrosion caverneuse

La corrosion dite caverneuse, ou par effet de crevasse, se produit dans les interstices du métal. La « crevasse » est une zone de confinement de faible volume où les échanges de matière avec l'extérieur sont très ralentis. La réaction de dissolution du fer provoque l'accumulation de Fe^{2+} dans le milieu confiné. En parallèle, les ions Cl^- de l'eau de mer vont se concentrer au niveau de l'interstice. La réaction des cations Fe^{2+} avec l'eau produit alors de l'hydroxyde ferreux et de l'acide chlorhydrique :



Le milieu confiné dans la crevasse tend donc à s'acidifier. Cette acidification accélère la dissolution anodique, ce qui entretient la diminution du pH au sein de la cavité et ainsi de suite : le phénomène est donc qualifié « d'auto-catalytique ».

II.3.3. Corrosion par piqûres

La corrosion par piqûres est comme son nom l'indique la forme la plus localisée qui soit. Elle implique le plus souvent la présence combinée d'ions agressifs particuliers, notamment les ions chlorures, et d'un défaut à la surface du matériau (rayure, inclusion, défaut du film protecteur ...). La quantité de métal corrodé est faible mais ce type de corrosion peut conduire à une perforation rapide des structures destinées à contenir un liquide ou un gaz (tuyaux, réservoirs, etc.) et est donc dans ce cas très dommageable.

II.4. Produits de corrosion

Les produits de corrosion du fer constituent ce qu'on appelle communément la « rouille ». Rappelons que ce terme, emprunté au langage courant, désigne une réalité scientifique complexe. La rouille est un mélange de différentes phases et sa composition varie selon le milieu et le matériau considérés. Les constituants principaux de la rouille sont les oxyhydroxydes ferriques (FeOOH) qui lui confèrent cette coloration si caractéristique, mais la rouille peut aussi contenir des composés incluant d'autres éléments chimiques que le fer, l'oxygène et l'hydrogène. Dans les milieux carbonatés, la sidérite FeCO_3 pourra ainsi se

former, dans les milieux sulfurés les différents sulfures de fer pourront être observés, et ainsi de suite. D'autre part, deux états de valence différents, Fe(II) et Fe(III), sont impliqués. Les composés de Fe(II) et les composés à valence mixte Fe(II-III) sont les précurseurs transitoires à partir desquels se forment les composés de Fe(III).

La description des propriétés générales des composés présentés ci-après est extraite de [13]. Nous nous focaliserons essentiellement sur les produits susceptibles de se former en milieu marin.

II.4.1. Les oxydes de fer.

La magnétite

La magnétite est un oxyde ferrimagnétique de couleur noire. Elle a la particularité de posséder à la fois des ions Fe^{2+} et Fe^{3+} selon un rapport de 1:2 à la stœchiométrie. Sa formule Fe_3O_4 peut donc aussi être développée en $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{O}_4$.

La maghémite

La maghémite est la phase $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ et sa structure est similaire à celle de la magnétite. En fait, l'oxydation partielle de Fe(II) en Fe(III) dans la magnétite conduit à une phase dite « lacunaire », de formule $\text{Fe}_{3-x}\text{O}_4$, c'est-à-dire $\text{Fe}^{\text{II}}_{1-3x}\text{Fe}^{\text{III}}_{2+2x}\text{O}_4$. La maghémite peut alors être considérée comme le composé où la totalité du Fe(II) est oxydée ($x = 1/3$). La maghémite résulte d'ailleurs dans la majorité des cas de l'oxydation de la magnétite.

L'hématite

Cet oxyde de fer de formule $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ est l'oxyde le plus stable thermodynamiquement. Il résulte essentiellement de l'oxydation du fer à haute température. Cette phase est ainsi très rarement observée au sein des produits de corrosion. Par contre, elle peut être obtenue par chauffage d'oxyhydroxydes : un des risques associés à l'analyse par micro-spectroscopie Raman est un échauffement excessif du produit analysé par le faisceau laser incident, qui peut conduire à sa transformation en hématite.

II.4.2. Les oxyhydroxydes ferriques.

La goethite

La goethite est l'oxyhydroxyde ferrique le plus stable thermodynamiquement. C'est la forme allotropique la plus communément retrouvée dans l'environnement. Elle est avec la lépidocrocite et la magnétite l'un des principaux produits de l'oxydation des rouilles vertes RV (qui seront décrites plus loin) [14-16].

La lépidocrocite

Cet oxyhydroxyde ferrique est beaucoup moins abondant dans l'environnement que la goethite et est presque exclusivement retrouvé dans les sols hydromorphes. Il se forme suite à une alternance de périodes d'anaérobiose et d'aérobiose. En anaérobiose, Fe(II) se forme puis s'oxyde en phase d'aérobiose et précipite ensuite sous forme de γ -FeOOH. La lépidocrocite est par contre fréquemment identifiée dans les couches de produits de corrosion des aciers. Elle est notamment l'un des principaux produits de l'oxydation des rouilles vertes [14-18].

L'akaganéite

Ce composé est considéré comme la phase β -FeOOH. Il contient cependant toujours des ions Cl^- (ou F^-), sans lesquels sa structure n'est pas stable. Sa formule chimique doit donc s'écrire $\text{FeO}_{1-x}(\text{OH})_{1+x}\text{Cl}_x$ [19,20]. L'akaganéite est l'un des produits de la corrosion marine des aciers mais elle semble plutôt caractéristique de phénomènes de corrosion localisée. En effet, sa formation requiert des concentrations élevées en espèces Cl^- et Fe(II) dissoutes [20], conditions réalisées dans des piqûres ou des crevasses où le confinement du milieu permet l'accumulation de telles espèces. L'akaganéite peut se former à partir d'un composé précurseur, la rouille verte chlorurée RV(Cl) ou l'hydroxychlorure ferreux $\beta\text{-Fe}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ [21,22].

La ferrihydrite

Ce terme désigne une famille de composés de faible cristallinité. On distingue communément la ferrihydrite « 6 lignes » de la ferrihydrite « 2 lignes » selon le nombre de pics observés sur les diffractogrammes de rayons X [23]. La ferrihydrite « 2 lignes » constitue la phase la moins bien cristallisée et la moins bien organisée des oxyhydroxydes ferriques. La composition est souvent écrite $\text{Fe}_5\text{HO}_8 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [24], ce qui peut aussi s'écrire comme une phase FeOOH hydratée, $5\text{FeOOH} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La ferrihydrite est notamment observée en présence de substances

qui inhibent la cristallisation des oxyhydroxydes ferriques, telles que le phosphate par exemple [25]. Elle peut aussi résulter de cinétiques de corrosion très rapides [26].

II.4.3 Les rouilles vertes

Les rouilles vertes sont des hydroxysels à valence mixte Fe(II-III). La structure cristalline de ce genre de composés [27,28] est constituée de feuillets d'hydroxyde $[\text{Fe}^{\text{II}}_{(1-x)}\text{Fe}^{\text{III}}_x(\text{OH})_2]^{x+}$ chargés positivement de par la présence des cations Fe(III). Afin de restaurer la neutralité électrique, des anions monovalents ou divalents (Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} ...) s'insèrent entre les feuillets d'hydroxydes, formant ce que l'on appelle des intercouches. On peut ainsi écrire la formule générale des rouilles vertes sous la forme : $[\text{Fe}^{\text{II}}_{(1-x)}\text{Fe}^{\text{III}}_x(\text{OH})_2]^{x+} [(x/n)\text{A}^{n-}(p/n)\text{H}_2\text{O}]^{x-}$ où A^{n-} désigne les anions intercalés. Les premières études par diffraction des rayons X (DRX) ont conduit à distinguer deux types de rouilles vertes [29]. Dans les rouilles vertes 1, l'anion interfoliaire possède une géométrie sphérique (Cl^-) ou plane (CO_3^{2-}). Dans cette structure, les molécules d'eau et les anions ne forment qu'une seule couche intercalaire [27,28,30]. A l'inverse, au sein des rouilles vertes de type 2, l'anion interfoliaire possède une géométrie tétraédrique (SO_4^{2-}) et forme deux plans intercalaires successifs avec les molécules d'eau [31]. La figure 1.3 présente un schéma de la structure de cette rouille verte.

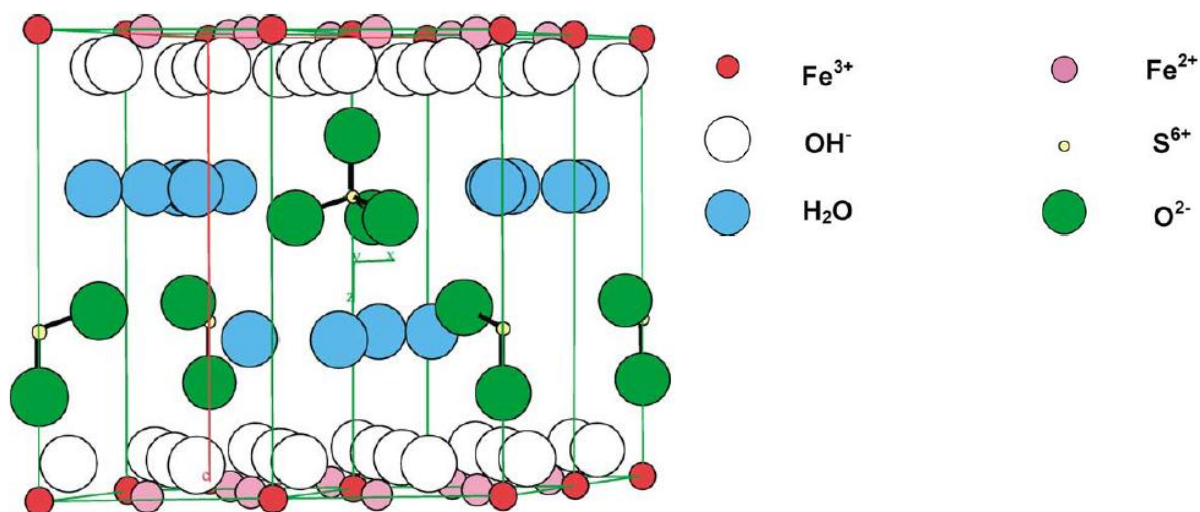


Figure 1.3 : Schéma général de la structure de $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$ [31].

La première découverte d'un de ces composés en tant que produit de corrosion des aciers date de 1969 [32]. La variété carbonatée des rouilles vertes, RV(CO₃²⁻) de formule Fe^{II}₄Fe^{III}₂(OH)₁₂CO₃ · 2H₂O [32-34], fut alors observée au sein de la couche de rouille d'une canalisation d'eau de réseau urbain. Une série de travaux ultérieurs a alors permis de montrer que ce composé se formait aisément dans les milieux carbonatés, dans une relativement large gamme de concentration en espèces carbonates [35-38].

D'autres travaux ont par la suite mis en évidence la formation de la variété sulfatée, (de formule Fe^{II}₄Fe^{III}₂(OH)₁₂SO₄ · 8H₂O [31]) dans la couche de rouille formée sur acier en milieu marin [1,2,39-41]. Tout d'abord, RV(SO₄²⁻) a été identifiée dans des cas de corrosion localisée associés à un développement de bactéries sulfato-réductrices (BSR) [39,40]. Il a alors été supposé que la formation de cette rouille verte RV(SO₄²⁻) pouvait avoir été induite par les micro-organismes. Il a été démontré par la suite que RV(SO₄²⁻) résultait en fait du processus purement électrochimique de la corrosion des aciers en milieu marin [1,2,41]. Les ions Cl⁻ sont très majoritaires dans l'eau de mer mais les anions divalents confèrent une plus grande stabilité aux composés de type rouille verte et s'intercalent dans la structure préférentiellement aux anions monovalents [41,42].

L'équivalent naturel de la RV a été baptisé fougérite [43]. En effet, la formation de rouille verte en milieu naturel, sans intervention anthropique, a été mise en évidence pour la première fois au sein de sols hydromorphes de la forêt de Fougères en Bretagne [44,45].

II.4.4. Les sulfures de fer.

Les sulfures de fer constituent un groupe varié de solides dont plusieurs jouent un rôle dans les systèmes marins. A température ambiante, on ne retrouve pas moins de sept composés dont la plupart sont métastables [46]. La mackinawite est le composé qui précipite à partir des espèces Fe(II) et S(-II) dans des conditions usuelles de température et de pH. Le précipité initial est une mackinawite nanocristalline [47], dont la cristallinité augmente plus ou moins rapidement en fonction de différents paramètres tels que pH et température [48]. Ce composé possède une structure et une composition bien définies. Le rapport Fe/S de la mackinawite synthétique est rigoureusement égal à 1 [49]. La formule FeS qui sert à le décrire est donc bien stœchiométrique contrairement à ce que l'on peut trouver dans la littérature sous la formule Fe_{1+x}S. Dans l'eau de mer, où en l'absence de micro-organismes sulfurogènes, la seule espèce soufrée est l'ion SO₄²⁻, la présence de mackinawite dans la couche de rouille est un bon indicateur de la présence et de l'activité de tels micro-organismes à la surface de l'acier. Comme la plupart des composés de Fe(II), la mackinawite est très sensible à l'action

de O₂ dissous. Dans les premiers stades de son oxydation, les cations Fe(II) sont oxydés en cations Fe(III) in situ au sein du réseau cristallin, sans modification notable de la structure [48]. Le composé correspondant est donc une mackinawite partiellement oxydée, de formule Fe^{II}_{1-3x}Fe^{III}_{2x}S.

II.4.5. Autres produits de corrosion.

Sidérite et chukanovite

Ces deux composés sont des produits de corrosion carbonatés susceptibles de se former en conditions anoxiques même à de faibles concentrations en espèces carbonates. Ils entrent en compétition avec la rouille verte carbonatée et les conditions favorables à la formation de l'un ou l'autre de ces composés ont fait l'objet de différentes études [37,50,51]. La sidérite est le carbonate de Fe(II) de formule FeCO₃, produit de corrosion des aciers connu et étudié depuis très longtemps. La chukanovite est un hydroxycarbonate ferreux de formule Fe₂(OH)₂CO₃, découvert récemment sur certains objets archéologiques ferreux [52,53] et observé sur un acier placé dans l'argile à 90°C [54].

L'hydroxychlorure ferreux β-Fe₂(OH)₃Cl

Ce composé est connu comme un précurseur de l'akaganéite et de la rouille verte chlorurée [21,22]. A notre connaissance, il n'a jamais été observé comme produit de corrosion des aciers contemporains. Cependant, il a été observé dans les couches de rouille d'objets archéologiques ferreux [55,56]. Plus récemment, il a été montré que β-Fe₂(OH)₃Cl constituait la majeure partie de la couche de produits de corrosion recouvrant des lingots de fer gallo-romains ayant séjourné 2000 ans dans la mer Méditerranée [57]. Ce composé semble donc plutôt typique des mécanismes de la corrosion marine aux très longs temps d'immersion. Il est très sensible à l'action oxydante de O₂ dissous et ne peut perdurer, comme la plupart des composés à base de Fe(II), qu'en conditions anoxiques.

II.5. Organisation des produits de corrosion dans le cas d'aciers faiblement alliés immergés en eau de mer naturelle

On considère généralement que la couche de produits de corrosion formée sur acier en milieu marin est constituée de deux strates principales. La strate externe, en contact avec l'eau de mer, est décrite en général comme peu adhérente. Elle est de couleur rouge brique/brun et constituée principalement d'oxyhydroxydes ferriques (goethite et lépidocrocite). La strate interne, fine et adhérente, est de couleur noire et contient notamment de la magnétite [58].

En 1999, Bousselmi et coll. [59] observent la présence d'une troisième couche, intermédiaire, constituée de rouille verte sulfatée. En vertu des résultats obtenus par spectroscopie d'impédance électrochimique, cette couche jouerait un rôle important dans la limitation du transport de matière entre le métal et le milieu.

En 2000, Memet [7] décrit la chronologie de formation des produits de corrosion sur des structures en acier au carbone immergés en milieu marin. Une première couche d'oxyhydroxydes ferriques poreuse se forme rapidement et tend à s'épaissir. Après 3 mois, une couche de magnétite se forme à l'interface métal/couche externe (oxyhydroxydes) et forme une barrière limitant l'apport d'oxygène à la surface du métal. Entre 6 et 21 mois, l'organisation des produits de corrosion change et les strates sont désorganisées. Il semble y avoir dislocation des strates, ce qui provoque l'oxygénation et donc l'oxydation de la magnétite en oxyhydroxydes ferriques.

Cette stratification a été décrite plus complètement en 2003 [41] via l'analyse de couches de rouille formées sur acier après 25 ans d'immersion. Une strate de rouille verte sulfatée a été observée au dessus des couches de magnétite et d'oxyhydroxydes ferriques, donc plutôt en partie externe de la couche de rouille. Une photographie prise lors des observations en microscopie électronique à balayage (MEB) est présentée sur la figure 1.4. On y distingue clairement des cristaux en forme de plaquettes hexagonales. L'analyse élémentaire effectuée conjointement a montré que ce composé était constitué de fer, d'oxygène et de soufre. Elle a donc confirmé les analyses Raman ayant démontré la présence de $RV(SO_4^{2-})$. L'influence de bactéries marines dans le processus de formation de ces produits de corrosion a été envisagée. Une des hypothèses émises implique la réduction de $Fe(III)$ en $Fe(II)$ par des bactéries ferri-réductrices (BFR).

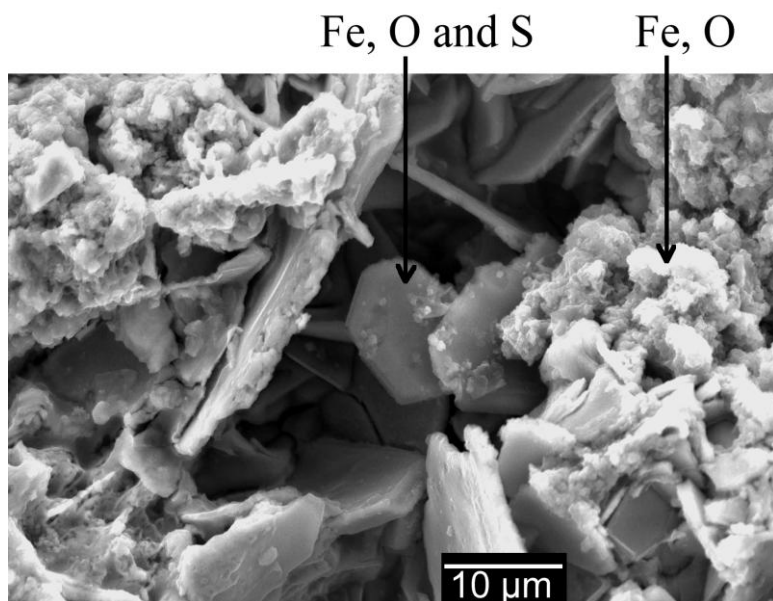


Figure 1.4 : Image prise au MEB montrant des cristaux hexagonaux de $\text{Fe}(\text{OH})_3$ au sein de la strate externe de la couche de rouille d'un acier après 25 ans en milieu marin [7,41].

Certaines expérimentations sur site portuaire ont permis d'observer le développement d'une couche interne de sulfure de fer, clairement associé à la colonisation de la couche de rouille par des BSR [60].

Les travaux récents de la thèse de S. Pineau [1,2], impliquant une analyse multi-techniques détaillée du système, ont abouti à une description plus fine de la couche de rouille. En réalité, lorsque le métal est immergé dans un milieu naturel, la notion de « couche de rouille », définie en première approche comme clairement distincte du milieu environnant, doit être reconsidérée. Il semble que la couche de produits de corrosion ne constitue pas une barrière compacte isolant le métal du milieu. De par son importante porosité, cette couche constitue une zone particulière où les produits de la corrosion du fer vont coexister avec des espèces minérales solides ou dissoutes, des composés organiques issus de l'activité biologique et des micro-organismes provenant du milieu extérieur. La couche de rouille formée sur un acier immergé en milieu marin, colonisée par une grande variété d'espèces bactériennes, constitue ainsi un écosystème particulier, différent du milieu environnant. Cette étude a porté sur des échantillons immergés de 6 à 12 mois en différentes zones de différents sites portuaires [1,2]. Dans tous les cas, la couche de rouille a montré, comme décrit dans les travaux précédents, une stratification en deux parties. La partie externe orangée est effectivement constituée d'oxyhydroxydes ferriques tandis que la partie interne s'est avérée essentiellement constituée de rouille verte sulfatée et de sulfure de fer. La magnétite est également présente, comme reportée dans les travaux antérieurs, mais ne constitue pas un

produit majoritaire de la corrosion à ce stade. Il est intéressant de noter que seule la combinaison de plusieurs techniques d'analyse, appliquée à une couche de rouille strictement protégée de l'action oxydante de l'oxygène, permet de décrire complètement le système. Le sulfure de fer n'a par exemple été détecté que par le biais de la micro-spectroscopie Raman. Il s'agit en effet de la mackinawite nanocristalline, qui ne donne qu'un faible signal en diffraction des rayons X. La présence systématique de sulfures de fer sur les échantillons, indépendamment de la zone et du port considérés indique que l'influence des BSR est un trait général de la corrosion marine et non une particularité.

La thèse de S. Pineau est aussi la première étude où des techniques de biologie moléculaire ont été appliquées à la caractérisation de bactéries associées à des couches de rouille. Elles ont notamment permis de montrer que les BSR se trouvaient principalement en zone interne, associées à la rouille verte sulfatée et aux sulfures de fer. Elles ont en outre permis de montrer que les dépôts de corrosion accueilleraient une importante diversité bactérienne.

Ainsi, l'influence des bactéries sur le processus de corrosion marine semble inéluctable. Par conséquent, les mécanismes de la corrosion marine des aciers ne peuvent être décrits sans que soit prise en compte la dimension biologique du processus. Ils impliquent manifestement des interactions entre la physico-chimie du fer et les métabolismes bactériens. Différentes études récentes ont ainsi porté sur les interactions mettant en jeu les oxyhydroxydes ferriques, qui peuvent être réduits en $RV(SO_4^{2-})$ [61,62] et celles mettant en jeu $RV(SO_4^{2-})$ elle-même, qui peut servir de réservoir de sulfate aux BSR [3]. Ces travaux montrent que $RV(SO_4^{2-})$ pourrait jouer un rôle important dans les mécanismes de la biocorrosion des aciers en milieu marin.

III. Diversité des micro-organismes en environnement marin

III.1. La classification des micro-organismes

La classification des micro-organismes est leur mise en ordre en groupes taxonomiques (taxons) sur la base de similitudes ou de parenté. Autrefois réalisée uniquement à partir de critères morphologiques et métaboliques, cette classification a été redéfinie sur des bases phylogénétiques et est en évolution permanente. La classification traditionnelle repose sur une hiérarchie fixe de catégories (les rangs de taxon), définie de la façon suivante :

Domaine → règne → embranchement (ou division ou phylum) → classe → ordre → famille
→ genre → espèce

L'ensemble des organismes vivants est classé dans 3 domaines. Les micro-organismes se répartissent sur les trois :

- les bactéries (*Bacteria*), anciennement nommées Eubactéries, sont des organismes unicellulaires à structure procaryote (leur matériel génétique, ADN circulaire, n'est pas enfermé dans un noyau) qui possèdent une paroi cellulaire constituée de peptidoglycane.

- Les archées (*Archea*), anciennement assimilés aux bactéries sous le nom d'Archéobactéries, sont également des organismes unicellulaires à structure procaryote. Ils possèdent une paroi cellulaire constituée de lipides spécifiques. D'un point de vue écologique, ce sont souvent des extrémophiles, notamment des halophiles et thermophiles. Ce groupe de micro-organismes est encore très peu exploré et la distinction entre les bactéries et les archées n'est pas encore adoptée par la totalité de la communauté scientifique. A tort, le terme de bactéries englobe encore très souvent à la fois les « vraies » bactéries et les archées.

- Les eucaryotes (*Eucarya*) peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires. Leur matériel génétique, sous forme de chromosomes linéaires, est enfermé dans un noyau délimité par une membrane. Dans ce domaine, seuls les protistes et certains champignons sont des micro-organismes.

Dans le contexte de la biocorrosion, les procaryotes sont les principaux micro-organismes étudiés et donc incriminés. Les auteurs font souvent référence à des groupes métaboliques (flore sulfurogène, sulfo-oxydante, ferriréductrice, etc.). Or dans la majorité des

cas, un groupe métabolique peut comprendre plusieurs familles de bactéries ou d'archées, phylogénétiquement éloignées.

III.2. Les procaryotes en environnement marin

Les procaryotes représentent la plus grande diversité des espèces biologiques sur terre. Ils jouent un rôle majeur dans les cycles biogéochimiques, présentent des capacités métaboliques exceptionnelles, sont capables de survivre aux conditions les plus extrêmes et sont nécessaires à la survie d'organismes supérieurs.

La quantité de procaryotes peuplant les océans a été estimée à 10^{29} cellules [63]. Ce nombre n'est cependant qu'une estimation car il est impossible de quantifier la totalité de la biomasse à l'heure actuelle. Il existe des différences significatives entre les populations bactériennes océaniques et côtières, notamment du fait d'apports nutritifs plus importants en environnement côtier [64]. La phylogénie des principaux groupes de procaryotes en eaux de mer (planctoniques, c'est-à-dire libres, en suspension dans l'eau) est présentée dans la figure 1.5 [65]. L'un des groupes les plus énigmatiques dans les océans est le groupe des *Archaea*. Ce groupe serait l'un des plus abondants sur la planète [65]. On ne sait pas cultiver, dans leur grande majorité, ces micro-organismes. En fait, la plupart des bactéries et archées marines (et de l'environnement en général) ne sont pas cultivables à l'heure actuelle. Jusqu'à ces dernières années, leur culture était pourtant nécessaire à leur identification. Beaucoup de groupes ne sont donc pas clairement identifiés en termes de distribution et d'activité métabolique en comparaison des millions d'espèces supposées existantes [65].

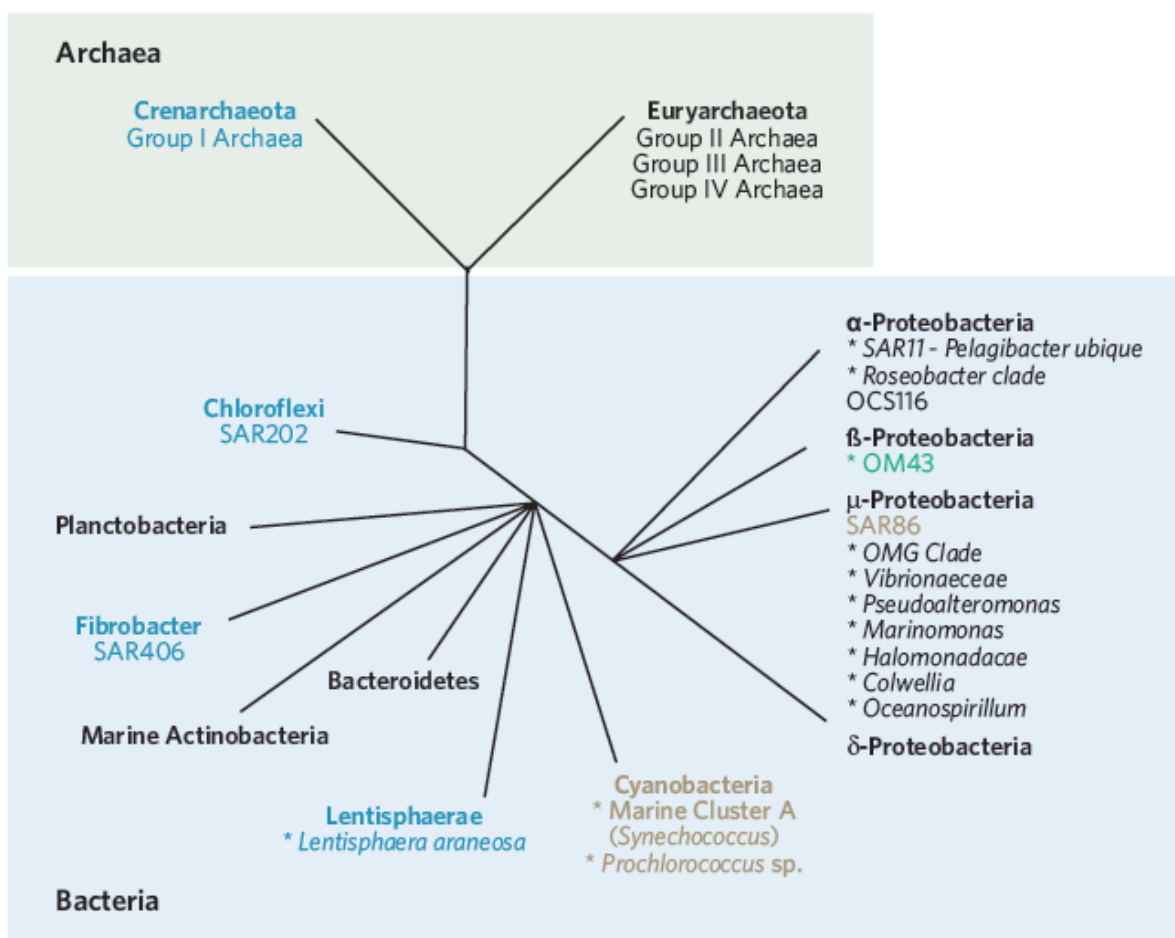


Figure 1.5 : Illustration schématique de la phylogénie des principaux procaryotes planctoniques en eau de mer. En noir : groupes microbiens semblant être ubiquitaires en eau de mer. En marron : groupes identifiés dans la zone exposée à la lumière. En bleu : groupes confinés dans les eaux de surface et mésopélagiques au cours des hivers polaires. En vert : groupes associés aux écosystèmes côtiers océaniques. Avec * : groupes pour lesquels des isolats cultivables sont disponibles. Issus de [65].

Néanmoins, l'évolution des outils de biologie moléculaire ces 20 dernières années a offert des grandes potentialités et a permis une avancée notable dans l'identification de nouvelles espèces. Une des conséquences est que l'arbre phylogénétique des micro-organismes et des procaryotes en particulier est constamment révisé, voire contesté [66]. En 2002, Hangstrom [67] avance, après comparaison des séquences déposées dans la banque de données *GenBank*, que la diversité bactérienne marine représenterait quelques milliers d'espèces et qu'environ 360 nouvelles espèces seraient séquencées et déposées en banque de données chaque année. Ces apports annuels ne semblent pas modifier l'ordre de grandeur de

la biodiversité comprise entre 10^3 et 10^4 espèces [68]. Cependant les techniques d'estimations peuvent varier et fournir des résultats allant jusqu'à 10^9 espèces bactériennes marines [69-71].

IV. Les micro-organismes impliqués dans la corrosion marine des aciers

Lors du processus de corrosion, le facteur biologique est susceptible d'intervenir pour induire ou accélérer le phénomène. La corrosion est qualifiée alors de biocorrosion, biodétérioration des matériaux ou encore corrosion influencée (ou induite) par les micro-organismes (MIC, *Microbially Influenced Corrosion*). La norme ISO 8044 (1999) définit les termes « corrosion microbienne » et « corrosion bactérienne » comme les interactions entre le vivant et le matériau. En général, les micro-organismes n'utiliseraient pas directement les matériaux comme source de nutriments. Cependant, la modification drastique des conditions environnementales à la surface de celui-ci, sous l'influence du métabolisme microbien, est susceptible d'induire ou d'accélérer sa dégradation.

IV.1. Notions de métabolisme bactérien

Le métabolisme chez les micro-organismes correspond à l'ensemble des réactions chimiques se produisant au sein de l'organisme et par lesquelles certaines substances sont synthétisées (anabolisme) ou dégradées (catabolisme). Toutes les formes de vie dépendent de centaines de réactions métaboliques simultanées et précisément régulées, permettant la multiplication des cellules et leur survie.

La synthèse de la vaste gamme de molécules qui forment la structure d'une cellule vivante demande de l'énergie. Une très grande partie de l'énergie obtenue lors de la dégradation de substrats est utilisée dans les réactions de biosynthèse. Ces réactions commencent en général avec des précurseurs simples (molécules inorganiques et monomères) pour donner des molécules de plus en plus complexes jusqu'à former des organites et de nouvelles cellules. Tous les composés qui constituent et qui sont formés par les organismes vivants sont des composés carbonés. C'est pourquoi, habituellement, les métabolismes du carbone et de l'énergie sont étroitement liés.

Certaines bactéries dites autotrophes sont capables d'utiliser le dioxyde de carbone

pour la totalité de leurs besoins en carbone. Néanmoins, la majorité des bactéries sont hétérotrophes c'est-à-dire que leur croissance dépend d'un apport de composés carbonés complexes. Pris dans leur ensemble, les hétérotrophes peuvent employer une grande variété de sources de carbone comprenant des sucres, des acides gras, des alcools et diverses autres substances organiques. Cette notion de type nutritionnel est présentée dans le tableau 1.2.

Besoins		Types nutritionnels
Source de carbone	CO ₂	Autotrophe
	Composé organique	Hétérotrophe
Source d'énergie	Lumineuse	Phototrophe
	Chimique	Chimiotrophe
Substrat énergétique (donneur d'électrons)	Minéral	Lithotrophe
	Organique	Organotrophe

Tableau 1.2 : Types nutritionnels bactériens [72]

Les chimiotrophes obtiennent leur énergie en métabolisant les substances chimiques de leur environnement et les phototrophes utilisent l'énergie lumineuse (tableau 1.2). A partir de ces sources primaires d'énergie, des réactions d'oxydo-réduction se produisent en chaîne. Ces réactions correspondent à un transfert d'électrons entre un réducteur, ou donneur d'électrons (par exemple : composé organique, hydrogène, fer(II), sulfures, soufre) et un oxydant, ou accepteur d'électrons (par exemple : oxygène, nitrates, nitrites, sulfates, fer(III), carbonates, CO₂). L'accepteur terminal d'électrons est impérativement de l'oxygène moléculaire pour les bactéries aérobies strictes et une espèce ionique pour les bactéries anaérobies strictes (par exemple SO₄²⁻ pour les bactéries sulfato-réductrices). Le type d'accepteur terminal se retrouve dans la dénomination de certains groupes métaboliques bactériens. Par exemple, les bactéries sulfo-oxydantes ont comme accepteur terminal d'électrons les ions S²⁻, les bactéries ferro-oxydantes les ions Fe²⁺, etc... L'énergie de ces réactions d'oxydo-réduction successives est récupérée dans les systèmes microbiens pour aboutir à la formation de divers composés « riches en énergie » que les bactéries peuvent utiliser directement, le plus courant étant l'adénosine 5'-triphosphate (ATP).

Les différentes catégories nutritionnelles de bactéries ne sont pas mutuellement exclusives : il y a des bactéries qui peuvent, selon les conditions environnementales, utiliser l'une ou l'autre des sources d'énergie et de substrat carboné.

Les procaryotes généralement associés aux processus de biocorrosion des aciers sont impliqués dans les cycles du soufre et du fer : ils utilisent comme accepteur terminal d'électrons un composé dérivé du soufre ou du fer. Les principaux groupes issus de ces métabolismes tels que ceux des bactéries sulfato-réductrices, thiosulfato-réductrices, sulfoxydantes et plus succinctement des bactéries utilisant le fer pour leur métabolisme sont présentés dans la partie suivante.

IV.2. La microflore liée au cycle du soufre

IV.2.1. Cycle biologique du soufre

Le soufre se trouve naturellement en grande quantité, lié à d'autres éléments sous forme de sulfures (exemple : la pyrite) et de sulfates (comme le gypse, qui est du sulfate de calcium). Il se trouve sous forme libre près des sources chaudes et dans les régions volcaniques. Les réservoirs de soufre mobile sont l'atmosphère, les lacs et les rivières, les sols et végétaux terrestres, les océans et leurs sédiments ainsi que la biosphère marine.

Le cycle du soufre est un cycle biologique majeur et complexe (figure 1.6). Dans la nature, les deux parties du cycle du soufre, aérobie et anaérobie, sont en général superposées et se complètent. En anaérobiose, le cycle du soufre est entièrement microbien. Le sulfure provient de la réduction des sulfates par les bactéries sulfato-réductrices, de la réduction du soufre élémentaire par les bactéries sulfo-réductrices, de la réduction des thiosulfates par les bactéries thiosulfato-réductrices et de la décomposition bactérienne des protéines soufrées. Le sulfure est par la suite oxydé par les bactéries phototrophes anoxygéniques qui l'utilisent comme donneur d'électrons pour leur photosynthèse. En aérobiose, le cycle n'est biologique qu'en partie et le sulfure peut être oxydé par les bactéries chimiolithotrophes aérobies [73].

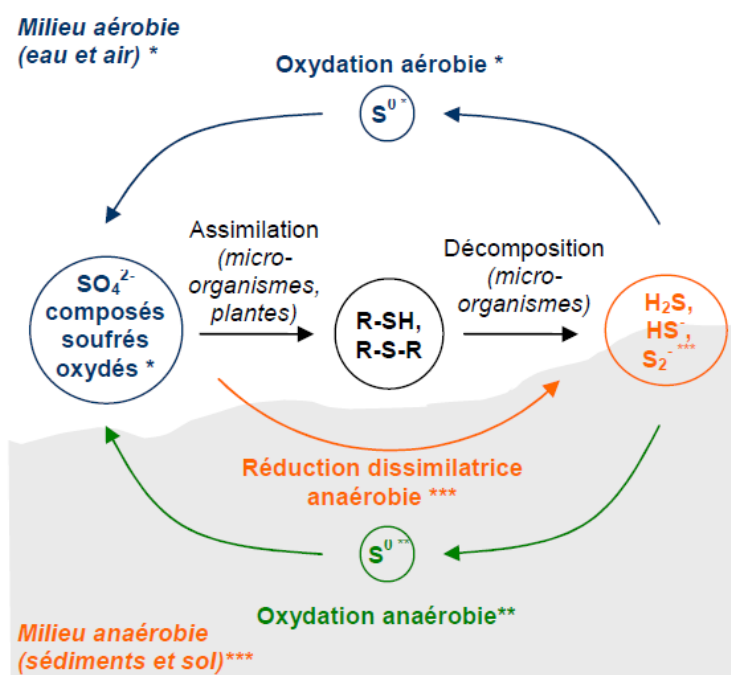


Figure 1.6 : Cycle biologique du soufre [74]

- * Micro-organismes sulfureux chimiolithotrophes
- ** Micro-organismes sulfureux phototrophes
- *** Micro-organismes sulfo- et sulfato-réducteurs

La réduction du sulfate et des formes oxydées intermédiaires du soufre conduit à deux résultats :

- *La génération d'ions sulfures nécessaires à l'anabolisme.* C'est la réduction assimilatrice des composés soufrés.
- *La production d'énergie.* Le sulfate et divers autres composés du soufre (excepté le sulfure) servent d'accepteur d'électron dans les oxydations génératrices d'énergie effectuées à l'abri de l'air. Cette réduction est dissimilatrice.

Une des conséquences de cette diversité métabolique au sein du cycle du soufre est la cohabitation favorable entre des groupes métaboliques tels que les bactéries sulfato-réductrices et les bactéries sulfo-oxydantes. Cette association permet de créer un cycle du soufre alternativement oxydé et réduit qui permet son renouvellement. Cette symbiose se développe dans des milieux variés tels que l'environnement marin, les sédiments, les lacs ou encore les biofilms [75].

IV.2.2. Bactéries sulfato-réductrices (BSR)

Les bactéries sulfato-réductrices sont celles qui ont été et sont encore les plus étudiées dans le domaine de la biocorrosion des aciers [1,2,76-78]. Elles sont considérées parmi les plus nocives et sont présentes dans de nombreux cas de corrosion accélérée de structures métalliques. Elles sont notamment impliquées dans la corrosion accélérée en basses-eaux des infrastructures portuaires [1,79-81]. La plupart des études récentes s'accordent cependant à attribuer un rôle clé aux consortia bactériens, notamment entre micro-organismes sulfurogènes et sulfo-oxydants [79,81].

D'un point de vue morphologique et physiologique, les bactéries sulfato-réductrices représentent un groupe de bactéries anaérobies complexe et varié [82,83]. Au sein des micro-organismes sulfurogènes, les bactéries sulfato-réductrices constituent le groupe microbien le plus important [84]. Elles appartiennent généralement au domaine des *Bacteria* à l'exception de trois espèces du genre *Archaeoglobulus* qui appartiennent au domaine des *Archea*. Parmi les *Bacteria*, les plus décrites sont *Desulfovibrio* avec quarante et une espèces et *Desulfomaculum* avec vingt espèces.

Ces micro-organismes, phylogénétiquement hétérogènes, partagent la propriété biochimique de réduction dissimilatrice du sulfate (SO_4^{2-}). En effet, leur métabolisme énergétique est assuré par la réaction d'oxydation d'un substrat généralement organique couplée à la réduction du sulfate, le sulfate jouant le rôle d'accepteur terminal d'électrons lors de la respiration anaérobie. Il existe de nombreuses molécules organiques pouvant être utilisées comme source de carbone et d'énergie par les BSR [85], telles que le lactate, le pyruvate, le malate ou certains alcools simples primaires. Cette capacité d'oxydation des substrats a permis de classer les BSR en deux groupes [86] :

- Le groupe I, chez lequel l'oxydation à partir du lactate et de l'éthanol est incomplète et s'arrête au stade acétate ou acétate et propionate. C'est le cas de *Desulfovibrio desulfuricans* ou *Desulfomaculum nigrificans*.
- Le groupe II, pour lequel l'oxydation complète du substrat carboné aboutit à la formation de CO_2 . C'est le cas de *Desulfobacterium autotrophicum*, *Desulfomonas* ou *Desulfobacter* [72].

Les accepteurs d'électrons sont également potentiellement nombreux. En effet, les BSR peuvent utiliser le sulfate, le thiosulfate, le sulfite, le soufre élémentaire mais aussi les nitrates et les nitrites. En plus de ces capacités métaboliques, certaines BSR sont aussi aptes à réaliser des fermentations.

Le métabolisme des BSR conduit à la génération de sulfures selon la réaction suivante :



Au pH de l'eau de mer, l'espèce HS^- prédomine et ces ions sulfures précipitent avec les ions ferreux en sulfures de fer selon la réaction suivante :



Les bactéries sulfato-réductrices peuvent coloniser un grand nombre de biotopes de par leur adaptabilité métabolique. La majorité des BSR sont mésophiles ou thermophiles. Les BSR mésophiles ont pour la plupart été isolées dans des sédiments marins, au sein desquels la concentration en sulfate est élevée et favorise leur développement [84]. Dans les écosystèmes marins où les sulfates abondent, la sulfato-réduction assure une part importante de la minéralisation. Mais les BSR ne se trouvent pas seulement en milieu marin. Elles sont en effet également retrouvées au sein de lacs acides, de sources hydrothermales terrestres ou océaniques ou encore de geysers. Enfin les activités humaines génèrent des biotopes propices à la prolifération de bactéries dissimilatrices de composés soufrés, notamment dans l'industrie pétrolière [84,85].

IV.2.3. Bactéries Thiosulfato-Réductrices (BTR)

Comme cela a été décrit ci-dessus, les bactéries sulfato-réductrices peuvent également être thiosulfato-réductrices. Cependant, des bactéries thiosulfato-réductrices (BTR), mais non sulfato-réductrices, représentent une communauté microbienne à part entière.

Le rôle du thiosulfate pour les BTR s'apparente à celui du sulfate pour les BSR. La réduction du thiosulfate suit la réaction suivante :



La réduction du thiosulfate a pu être observée en laboratoire par Le Faou en 1990 en conditions anaérobies strictes et facultatives [87]. Ce métabolisme a longtemps été attribué aux BSR jusqu'à ce qu'en 2000, Garcia [88] prouve l'existence d'une activité thiosulfato-réductrice anaérobie en l'absence de micro-organismes sulfato-réducteurs. Ce processus est important en milieu sédimentaire anaérobie. Récemment, de nombreux micro-organismes fermentaires anaérobies stricts mésophiles et thermophiles appartenant aux genres

Thermotoga, *Thermosipho* et *Ferrobacterium* se sont montrés capables de réduire le thiosulfate [83,89,90]. La réduction du thiosulfate est considérée comme une respiration [83,91].

IV.2.4. Bactéries sulfo-oxydantes (BSO)

Les micro-organismes sulfo-oxydants comprennent des bactéries chimiolithotrophes (qui tirent leur énergie de l'oxydation d'un substrat minéral) et des bactéries photosynthétiques (qui utilisent la lumière comme source initiale d'énergie). Ces deux groupes bactériens ont pour particularité d'assimiler le carbone du CO₂ (source de carbone) tout en oxydant des composés minéraux tels que les sulfures, le soufre élémentaire, le thiosulfate ou le sulfite, afin de générer de l'énergie. Il est possible de trouver des bactéries sulfo-oxydantes (BSO) dans des milieux allant de la saturation en oxygène jusqu'à l'anaérobiose. Les BSO photosynthétiques (bactéries phototrophes anoxygéniques) sont capables d'oxyder les composés soufrés en milieu anaérobie et les BSO chimiolithotrophes se trouvent en milieu aérobie. La plupart des BSO connues sont mésophiles et peuvent vivre à des pH allant de 1 à 9. Cependant certaines espèces sont thermophiles modérées ou extrêmes [92].

De nombreuses bactéries phototrophes sont capables d'utiliser les composés réduits du soufre comme source d'électrons [72]. Elles pratiquent alors une photo-dissimilation des composés soufrés tels que le sulfure, le soufre élémentaire, le thiosulfate ou le sulfite. Cette oxydation fait intervenir trois enzymes : la sulfite réductase, l'APS réductase et l'ADP sulfurilase [72]. Les bactéries sulfo-oxydantes photosynthétiques sont séparées en deux ordres : les *Chlorobiales* et les *Rhodospirillales*, c'est-à-dire respectivement les bactéries vertes et les bactéries pourpres. Les bactéries phototrophes sulfureuses pourpres peuvent également se développer à l'obscurité ou en micro-aérophilie et sont sensibles à des concentrations en sulfure supérieures à 4 mM [93]. Les bactéries pourpres peuvent oxyder le soufre et le sulfure jusqu'au stade sulfate, les composés soufrés intermédiaires ainsi formés s'accumulant au sein de la cellule. Les bactéries phototrophes sulfureuses vertes colonisent les habitats très riches en sulfure, généralement défavorables aux bactéries phototrophes pourpres. Les bactéries de l'ordre des *Chlorobiales* (*Chlorobium*, *Pelodyction*, *Prosthecochloris*) oxydent le soufre et le sulfure et accumulent du soufre élémentaire à l'extérieur de la cellule [72]. Enfin, il existe des bactéries vertes non-sulfureuses, appartenant au *phylum* des *Chloroflexi*. Le genre *Chloroflexus*, le plus fréquemment identifié, est capable d'oxyder le sulfure mais pas le soufre élémentaire [72].

En aérobiose, la sulfo-oxydation par les BSO chimiolithotrophes requiert des conditions précises : un environnement à la fois riche en sulfure et pauvre en oxygène. Les micro-organismes sulfo-oxydants les plus connus sont *Thiobacillus* (groupe des β -Protéobactéries), *Beggiatoa*, *Thiomicrospira*, *Thiotrix* (groupe des γ -Protéobactéries), ou encore *Sulfobulbus* (groupe V des Archées).

Les bactéries sulfo-oxydantes décrites dans les cas de biocorrosion sont généralement des *Thiobacillus*. Les représentants classiques sont *T. thiooxydans*, *T. denitrificans*, *T. thioparus*. Ces espèces sont des chimiolithotrophes stricts, elles ont besoin de CO_2 pour se développer et utilisent l'oxygène comme accepteur terminal d'électron. Les *Thiobacillus* oxydent les composés soufrés jusqu'au stade SO_4^{2-} . L'espèce *Thiobacillus denitrificans* est aérobie mais est également capable en anaérobiose d'utiliser le nitrate comme accepteur terminal d'électrons pour oxyder les composés du soufre, en libérant l'azote à l'état gazeux. En biocorrosion, le soufre ou le sulfure utilisées par ces bactéries peut provenir de dépôts atmosphériques, des pyrites (FeS_2) ou du sulfure d'hydrogène (H_2S) d'origine biologique ou chimique. L'utilisation de ce composé soufré comme donneur d'électrons permet la croissance des Thiobacilles couplée à la production d'acide sulfurique. Cet acide serait alors une cause de l'accélération de la corrosion [94]. Bien que les conditions préférentielles de croissance de ces BSO correspondent à l'autotrophie aérobie, conditions très différentes de celles des BSR, les deux groupes microbiens coexistent souvent. En effet, les BSR fournissent le sulfure d'hydrogène favorable au développement des BSO.

IV.3. La microflore liée au cycle du fer

IV.3.1. Le cycle du fer

Le fer existe sous deux formes, le fer ionique (le fer ferreux Fe^{2+} et le fer ferrique Fe^{3+}) et le fer minéral qui inclut les sulfures (pyrite), les sulfates, les oxydes et hydroxydes (hématite, magnétite) ainsi que les silicates et les carbonates (sidérite). Le fer est présent sous ses différentes formes dans de très nombreux environnements terrestres, lacustres ou marins. Cependant, la forme ionique, bien que largement présente au niveau des sources hydrothermales, est en faible quantité dans les environnements tels que l'océan. Le temps de résidence du fer ionique dans l'océan est très faible car il se transforme rapidement en $\text{Fe}(\text{OH})_3$ et précipite. Il est un des éléments mineurs essentiels à la plupart des organismes : bactéries, champignons, plantes et animaux. Le fer joue un rôle vital dans de nombreux

processus biologiques : la photosynthèse, la fixation de l'azote, la méthanogenèse, le transport de l'oxygène ou encore la synthèse de l'ADN. La disponibilité du fer est limitée par sa solubilité et sa cinétique de dissolution.

Le cycle du fer consiste en la transformation du Fer II en Fer III et inversement (figure 1.7). Ces opérations ont lieu dans différentes conditions physico-chimiques (pH, température, etc.) de manière abiotique ou biotique. La réduction ou l'oxydation du fer par les micro-organismes joue un rôle significatif dans ce cycle. Les micro-organismes associés au métabolisme du fer constituent le deuxième groupe le plus fréquemment cité dans les phénomènes de biocorrosion des aciers. On y retrouve les bactéries ferri-réductrices (BFR) et les bactéries ferro-oxydantes (BFO).

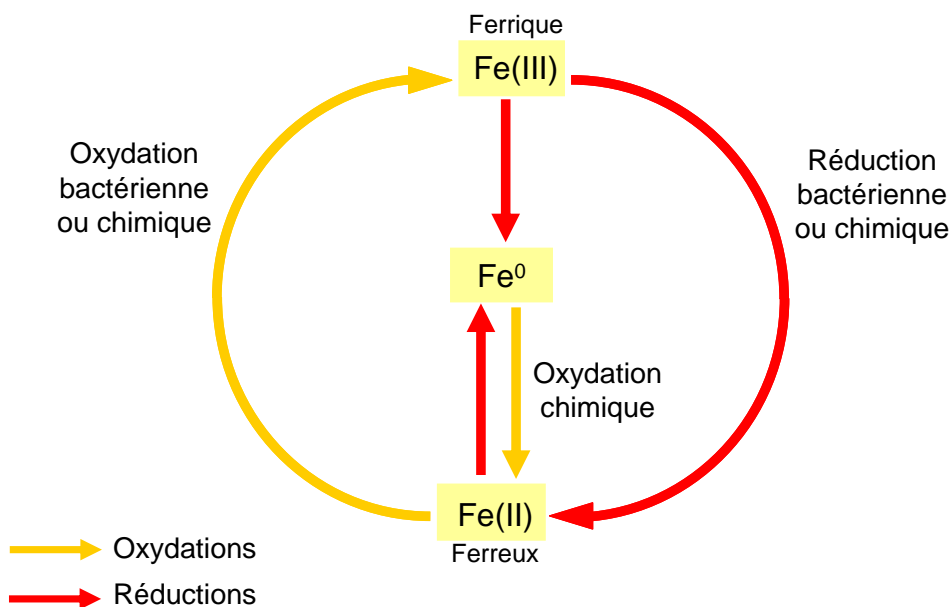


Figure 1.7 : Cycle biogéochimique du fer.

IV.3.2. Bactéries ferro-oxydantes (BFO)

L'oxydation chimique du fer ferreux aqueux dépend du pH et de la concentration en oxygène : le taux d'oxydation augmente lorsque le pH et la concentration en oxygène augmentent. A un pH acide ($\text{pH} < 4$), l'oxydation chimique du fer ferreux n'est plus significative et le fer ferreux est alors oxydé en fer ferrique par les BFO acidophiles pour obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance [95]. Elles utilisent pour la plupart le CO_2 comme source de carbone. Ce processus conduit à la précipitation d'oxydes de fer (FeOOH et Fe_2O_3). Les BFO acidophiles sont les plus étudiées. Elles sont présentes dans des environnements variés, elles vivent à un pH inférieur à 1 jusqu'à un pH proche de 5,5 et à des températures pouvant dépasser 65°C . De plus, les BFO acidophiles peuvent être autotrophes ou hétérotrophes comme *Acidiphilium* [96-98]. Les plus connues appartiennent majoritairement aux genres *Acidithiobacillus* (*thioxidans* et *ferrooxidans*), *Acidiphilium* et *Leptospirillum* [99]. Ces genres bactériens se retrouvent principalement dans les zones où le fer (II) est très présent, comme les eaux de drainage provenant de mines. La pyrite (FeS_2) présente dans ces eaux est oxydée en fer (III) et en soufre $\text{S}(0)$ ce qui provoque une acidification du milieu. Lors des phénomènes de biocorrosion, ce processus entre en jeu en induisant des colmatages ou une diminution de la perméabilité par la production d'hydroxydes ferriques difficilement solubles [100].

Dans les environnements aqueux à pH neutre ($\text{pH } 6 \text{ à } 8$) et saturé en oxygène (8 mg.L^{-1}), l'oxydation chimique du fer est rapide et les populations bactériennes ne représentent pas une part significative de l'oxydation. Cependant, en présence d'une faible concentration d'oxygène ($< 2 \text{ mg.L}^{-1}$), le taux d'oxydation chimique diminue et les BFO neutrophiles sont capables d'utiliser le fer ferreux comme source d'énergie. On retrouve des BFO neutrophiles dans des environnements variés comme les eaux usées, les racines de plantes, les stalactites ou encore les sources hydrothermales. La définition d'une bactérie ferro-oxydante neutrophile est liée au pH de croissance. Néanmoins, celui-ci peut être assez différent d'une bactérie à l'autre. Par exemple, *Acidiphilium cryptum* est une bactérie ferro-oxydante hétérotrophe, qui tolère un pH de 2,1 à 5,8 dans des conditions aérobies de croissance, mais à un pH supérieur, elle peut croître en conditions anaérobies. Dans ces conditions, *Acidiphilium cryptum* peut réduire le fer, ce qui lui permet une croissance au niveau du sédiment [101]. D'autres bactéries ont un pH de croissance plus proche de la neutralité, comme *Gallionella ferruginea* ou *Leptothrix ochracea*, connues depuis 1840, mais cultivées en laboratoire plus d'un siècle après. Cependant, leur effet catalytique sur l'oxydation et la précipitation du fer n'est pas encore complètement compris. L'existence de BFO neutrophiles n'est plus discutée, mais leur

rôle par rapport à l'oxydation chimique du fer est encore très mal compris et fait l'objet de plusieurs études dans les différents environnements où on les retrouve.

En absence d'oxygène, certaines bactéries phototrophes, pourpres ou vertes, oxydent Fe^{2+} en utilisant l'énergie lumineuse pour fixer le CO_2 [102]. Cette réaction conduit à la formation d'oxydes de fer peu cristallisés à l'extérieur de la cellule. Récemment, l'oxydation du fer par des bactéries capables de réduire le nitrate a été démontrée en anaérobie et en aérobie, en absence de lumière [103].

IV.3.3. Bactéries ferri-réductrices (BFR)

Des communautés bactériennes aéroanaérobies facultatives ou anaérobies strictes, les BFR, utilisent le Fe(III) comme accepteur d'électrons pour leur respiration [104]. Les donneurs d'électrons sont nombreux [105] tels que les produits de fermentation (hydrogène, acétate, lactate, alcools...), les acides organiques, les acides gras à longue chaîne ou encore les composés aromatiques. Ces derniers peuvent provenir de la décomposition de biomasse végétale. Les formes oxydées du fer sont présentes à l'état de solides insolubles amorphes ou cristallisés. La solubilité de Fe(III) augmente lorsque le pH diminue. Ainsi, à pH acide, les formes oxydées et les formes réduites cohabitent dans la phase soluble. Les BFR réduisent le fer en solution mais entraînent aussi la dissolution et l'altération des oxydes et hydroxydes.

Les BFR forment un groupe métabolique dans lequel les espèces peuvent être phylogénétiquement éloignées [106]. Les souches décrites appartiennent dans leur majorité aux *δ-Proteobacteria* et plus précisément aux genres *Geobacter*, *Desulfuromonas* et *Pelobacter*. Cependant, certaines appartenant aux *γ-Proteobacteria* telles que *Shewanella spp.* et *Geovibrio ferrireducens* sont aussi affiliées aux BFR [107]. Les BFR sont divisées en deux groupes suivant leur capacité à oxyder complètement ou non la matière organique en CO_2 . Cette oxydation est couplée à la réduction du fer (III) contenu dans les minéraux (ferrihydrite, goethite, hématite). Certains de ces minéraux sont également produits par la corrosion du fer en milieu marin. Dès lors, la présence de BFR pourrait modifier localement la couche de rouille, ce qui initierait la création de zones anodiques et induirait une différence de potentiel électrochimique propice au développement d'un processus de corrosion localisée [108].

IV.4 Le mode de vie « biofilm » des micro-organismes

Dans un écosystème aquatique, les micro-organismes se retrouvent sous 3 formes [109] : (i) planctonique (libres, en suspension dans la colonne d'eau), (ii) benthique (à la surface et dans les sédiments) et (iii) sous forme de biofilms (attachés à des substrats vivants ou non, organiques ou inorganiques) [110]. L'équilibre entre ces formes dépend des facteurs environnementaux comme le mouvement de l'eau et la disponibilité en substrat [109]. Le biofilm est un élément essentiel aussi bien au développement bactérien qu'à la colonisation d'une surface. Dès 1978, Costerton [111] propose que l'association de bactéries en biofilms serait le mode de vie naturel de la plupart des micro-organismes et particulièrement en milieu hostile. En effet, ce type d'organisation permet une grande résistance aux variations de conditions du milieu, que ce soit des températures extrêmes (-12°C à $+115^{\circ}\text{C}$), des pH compris entre 0 et 13, une salinité des milieux aqueux allant de 0 à saturation, ou encore des pressions hydrostatiques comprises entre 0,01 bar et 1400 bars [112]. L'action et l'activité communautaire, issue de cette structuration complexe, permettent aux micro-organismes de s'adapter plus rapidement en fonction des besoins ou des stress environnementaux. Les bactéries incluses dans un biofilm peuvent présenter des caractéristiques microbiologiques très différentes de leurs homologues planctoniques. Il a ainsi été montré que la simple adhésion d'une bactérie sur une surface était à l'origine d'une modification plus ou moins importante de l'expression de ses gènes [113,114].

Les biofilms sont constitués de communautés microbiennes complexes liées les unes aux autres par une matrice extracellulaire, composée de substances polymériques extracellulaires (EPS pour *Extracellular Polymeric Substances*), et présentant des hétérogénéités physiques, métaboliques et chimiques [115]. Les biofilms contiennent 80 à 95 % d'eau, une masse organique constituée de 85 à 98 % d'EPS, des micro-organismes, des particules organiques ou inorganiques (débris, argile, silice ...) et des substances dissoutes dans l'eau interstitielle [116]. La composition biologique des biofilms change avec les conditions environnementales, telles que l'intensité lumineuse, la vitesse d'écoulement de l'eau ou encore l'historique de la colonisation primaire. Dans certains cas, ils sont constitués exclusivement de bactéries alors que dans d'autres, ils évoluent vers des communautés plus complexes qui peuvent alors contenir des bactéries, des micro-algues (diatomées), des protozoaires et des champignons. La matrice extracellulaire définit les limites de cet écosystème.

Les biofilms ont une structure tridimensionnelle, déterminée par l'architecture de la matrice extracellulaire et présentant une microporosité élevée constituée de canaux ou pores, par lesquels circule l'eau chargée en nutriments, et où les bactéries sont arrangées sous forme de couches ou d'amas [1,117]. Selon les conditions de croissance et l'âge du biofilm, l'épaisseur de celui-ci varie de quelques microns à plusieurs centaines de microns.

Des interactions entre les micro-organismes et entre ceux-ci et le milieu extérieur, ainsi que des transferts de masse et d'énergie se produisent au sein de cet écosystème. Les interactions entre micro-organismes déterminent la structure et la diversité du biofilm et comprennent des processus d'adhésion spécifique, de transfert de gènes et de communication entre les cellules (« quorum sensing »). D'autre part, des interactions trophiques se mettent en place entre les différentes communautés d'organismes. La formation du biofilm se fait progressivement et cinq étapes ont été définies (figure 1.8).

La colonisation par les cellules planctoniques va d'abord se faire de manière réversible puis irréversible [118]. L'initiation de la formation du biofilm se fait en premier lieu par la formation d'un film d'ions organiques et inorganiques de haut poids moléculaire (film de conditionnement) lorsque l'adhésion directe n'est pas favorable [119]. Dès que ce film est mis en place, les bactéries vont commencer à y adhérer (étape 1, figure 1.8). A la fin de cette étape la population bactérienne peut atteindre une densité comprise entre 10^7 et 10^8 cellules/cm². Les bactéries vont ensuite se multiplier pour former une communauté bactérienne (2, figure 1.8). La colonisation progressive de la surface se fait via un processus appelé « recrutement » par Dang [120]. Les espèces bactériennes interagissent avec le biofilm par des liaisons chimiques non covalentes ou faibles. Intervient alors l'étape décisive d'adhésion irréversible par l'intermédiaire d'EPS dont des protéines organisées en structures similaires à celle des pili et par interactions synergiques entre les colonies présentes [121]. Ces interactions permettent d'augmenter la capacité d'ancrage d'autres micro-organismes. En milieu marin, ce phénomène est illustré par l'adhésion initiale de bactéries et de mycètes, puis d'espèces motiles hétérotrophes telles que les flagellés, ciliés ou amibes, puis d'espèces sessiles comme les diatomées et enfin des algues filamenteuses [118]. A ce stade, les micro-organismes vont produire une matrice de substances polymériques extracellulaires, élément clé du biofilm qui va contribuer à la structure tri-dimensionnelle du biofilm. C'est l'étape de maturation (3-4, figure 1.8). Une fois le biofilm formé, certaines espèces vont alors se détacher afin de coloniser d'autres surfaces (5, figure 1.8) [122].

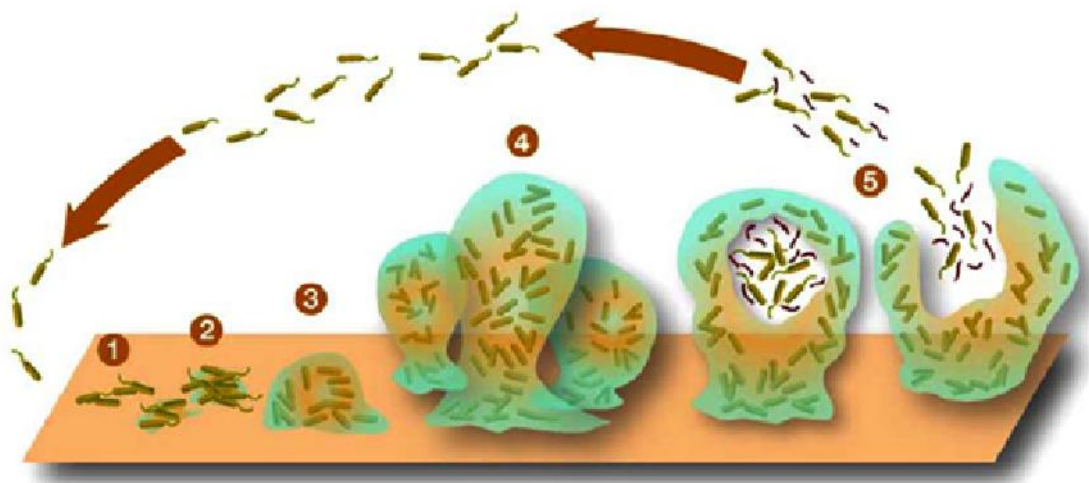


Figure 1.8 : Schéma de la formation d'un biofilm bactérien [111].

V. Les principaux mécanismes de la corrosion bactérienne

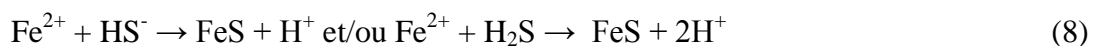
Les différents acteurs impliqués dans la biocorrosion, décrits dans la section précédente, interviennent via différents mécanismes :

- *Le biofilm* : le biofilm est généralement considéré comme un élément clé de la biocorrosion. En effet, il se forme à l'interface entre le milieu marin et l'acier et modifie donc les conditions environnementales à la surface de celui-ci. Les bactéries aérobies, situées en surface du biofilm vont consommer l'oxygène. Il va donc en résulter un gradient d'oxygène à travers le biofilm et les couches profondes peuvent ainsi devenir anaérobies [123]. Ce gradient va favoriser les phénomènes de corrosion par aération différentielle [124]. De plus, la formation du biofilm va modifier drastiquement la composition du milieu à l'interface du métal en limitant l'apport d'espèces chimiques issues du milieu marin et en introduisant la présence de métabolites provenant du métabolisme bactérien [124]. Ces altérations des conditions environnementales au contact du métal peuvent amener à des conditions extrêmes. Lewandoski en 1990 [125] a pu mesurer à l'aide de microélectrodes des pH inférieurs à 1 à l'interface métal-biofilm. Un autre aspect de l'impact des biofilms sur la biocorrosion est le fait que le biofilm ne soit pas homogène. En effet, on observe au sein du biofilm une

alternance entre des zones denses en bactéries et d'autres beaucoup plus pauvres. Des stratifications redox et des gradients de concentrations en éléments se forment également dans les biofilms [126]. Cette organisation créerait d'après Lewandowski une hétérogénéité au niveau du transport de masse induisant des différences électrochimiques à la surface du métal, c'est-à-dire des effets de pile galvanique entre des zones anodiques, où la corrosion va s'accroître, et des zones cathodiques, où la corrosion va être ralentie [127]. Cependant, l'effet négatif du biofilm est très souvent lié au métabolisme des populations bactériennes qui s'y sont développées.

- *Les bactéries sulfurogènes (BSR essentiellement)* : si leur influence est clairement établie, différents mécanismes sont proposés. Tout d'abord, il apparaît que le rôle des BSR est indirect et implique essentiellement les métabolites produits, et notamment les espèces sulfures particulièrement corrosives pour l'acier [128]. Par ailleurs, les sulfures de fer pourraient former sur la surface de l'acier une couche relativement protectrice, mais ses imperfections ou hétérogénéités favoriseraient des phénomènes de corrosion localisée accélérés [1,129-131], les zones recouvertes de sulfure de fer jouant le rôle de cathode, les zones découvertes le rôle d'anode.

La présence de sulfures conduit en outre à une acidification du milieu. Cette acidification résulte notamment de l'oxydation, en présence de O₂, des sulfures en sulfites, thiosulfate et sulfates [129,132,133]. Un modèle de régulation du pH par les BSR a ainsi été proposé [134]. Il prévoit que le pH d'un biofilm contenant des BSR serait de 6,7 en conditions anaérobies. Il descendrait à 5,4 dans des zones anodiques où l'accumulation d'ions Fe²⁺ conduirait à un surcroît d'acidification notamment via la précipitation de sulfures de fer selon la réaction :



En cas d'oxydation des sulfures par l'oxygène, le pH pourrait descendre à 6,2. Si les thiosulfates ou les polythionates alors formés étaient utilisés par les bactéries à la place du sulfate, le milieu pourrait s'acidifier localement jusqu'à pH = 3 dans les zones anodiques.

- *Les enzymes* : Le métabolisme des bactéries est régi par des activités enzymatiques. Les enzymes sont des protéines produites par les micro-organismes pour catalyser les réactions métaboliques. Ainsi, en conditions anaérobies, l'hydrogénase adsorbée sur la surface d'un métal peut catalyser la réaction de réduction de l'eau [135-138] et conduire éventuellement à une accélération de la corrosion.

Dans le même ordre d'idées, certaines bactéries, telle *Geobacter sulfurreducens*, sont capables d'utiliser directement une électrode métallique comme accepteur d'électrons [139-141]. Dès lors, en contrôlant le comportement électrochimique de l'acier, ces micro-organismes peuvent influencer sur les processus de corrosion [142].

- *Les espèces phosphates* : Différents auteurs attribuent un rôle significatif aux phosphates et à leurs dérivés. Par exemple, Iverson et coll. [143] ont montré que les BSR pouvaient libérer, à partir des phosphates, de la phosphine PH_3 . Celle-ci réagirait avec les espèces dissoutes de Fe(II) pour former des phosphures de fer (Fe_2P) stimulant la corrosion.

D'autre part, certains auteurs ont observé que la corrosion des aciers pouvait être accélérée par les hydrogénases uniquement en présence de phosphates [144]. L'implication possible des phosphates dans ces processus a été confirmée par la suite [145].

- *Les polymères extracellulaires (EPS)* : L'importance des EPS dans les phénomènes de corrosion n'a été que rarement reportée [146]. La capacité des EPS produits notamment par les BSR à se lier aux ions métalliques [147,148] pourrait cependant contribuer à accélérer la corrosion de l'acier.

- *Les consortia bactériens* : Il semble finalement assez clair que les mécanismes de la biocorrosion des aciers en milieu marin impliquent l'association de différents types bactériens avec les BSR. Le rôle des BSO a été révélé en premier lieu [79,81], tandis que celui des BFR semble de plus en plus plausible [41,61,62,149,150].

VI. Conclusions

Dans la droite ligne des travaux les plus récents [1-3,61,62,150] relatifs au fonctionnement global du système « acier / rouille / micro-organismes / milieu marin », nous avons orienté nos travaux vers la compréhension des interactions entre la physico-chimie du fer et le métabolisme de certains groupes bactériens. Nous avons ainsi adopté une stratégie en 3 axes :

- Etude des interactions $RV(SO_4^{2-})$ / BSR dans un système modèle, à l'instar des travaux décrits dans [3], mais dans des conditions expérimentales différentes, plus proches de celles rencontrées sur site. L'objectif est de confirmer le rôle central potentiel de $RV(SO_4^{2-})$.

- Suivi de l'évolution du système à la fois sous l'angle physico-chimique et sous l'angle microbiologique, comme effectué dans [1,2], pour mettre en évidence les corrélations entre physico-chimie du fer et métabolismes bactériens. L'emploi des techniques de biologie moléculaire sera développé et des durées d'immersion différentes de celles étudiées par [1,2] seront considérées. Elles seront couplées à des techniques d'analyse physico-chimiques telles que la diffraction des rayons X et la micro-spectroscopie Raman.

- Développement de modèles en laboratoire visant à simuler, en simplifiant certains aspects, le fonctionnement du système. Il sera fait appel dans cette section à des techniques électrochimiques pour synthétiser des couches de rouille modèles.

Références :

[1] S. Pineau, *Interactions entre les communautés bactériennes et les processus de corrosion accélérée des structures métalliques en environnement marin*, Thèse, Université de Technologie de Compiègne (2006).

[2] S. Pineau, R. Sabot, L. Quillet, M. Jeannin, Ch. Caplat, I. Dupont-Morrall, Ph. Refait, *Formation of the Fe(II-III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel associated to molecular detection of dissimilatory sulphite-reductase*, Corros. Sci. **50** (2008) p. 1099-1111.

[3] A. Zegeye, L. Huguet, M. Abdelmoula, C. Carteret, M. Mullet, F. Jorand, *Biogenic hydroxysulfate green rust, a potential electron donor for SRB activity*, Geochim. Cosmochim. Acta **71** (2007) 5450-5462.

[4] A. Aminot, M. Chaussepied, Manuel des analyses chimiques en milieu marin, Rapport CNEXO, Ifremer (Eds.) (1983).

[5] G. Copin-Montaigu, Chimie de l'eau de mer, Institut océanographique (Eds.), Paris (1996)

[6] E. Antoine, L. Lemoine, Agressivité de l'environnement marin, Rapport CNEXO / COB / TDI, Ifremer (1979).

- [7] J.B. Memet, *La corrosion marine des structures métalliques portuaires : étude des mécanismes d'amorçage et de croissance des produits de corrosion*, Thèse, Université de La Rochelle, 2000.
- [8] R.E. Melchers, *Modeling of marine corrosion of steel specimens*, dans : RM. Kain, W.T. Young (Ed.) « Corrosion testing in natural waters », deuxième volume, ASTM STP1300, Philadelphie, 1997, pp. 3 -33.
- [9] R.E. Melchers, *Mathematical modelling of the diffusion controlled phase in marine immersion corrosion of mild steel*, Corros. Sci. **45** (2003) 923-940.
- [10] R.E. Melchers, R. Jeffrey, *Early corrosion of mild steel in seawater*, Corros. Sci. **47** (2005) 1678-1693.
- [11] R.E. Melchers, T. Wells, *Models for the anaerobic phases of marine immersion corrosion*, Corros. Sci. **48** (2006) 1791-1811.
- [12] Ph. Refait, R. Sabot, J. Creus, J.B. Memet, *Anticorrosion en milieu marin*, in Prévention et lutte contre la corrosion ; une approche scientifique et technique, p.743-756, publié sous la direction de B. Normand, N. Pébère, C. Richard et M. Wery, Collection des sciences appliquées de l'INSA de Lyon, Presses Polytechniques Universitaires Romandes, 2004.
- [13] R. M. Cornell and U. Schwertmann, *The Iron Oxides* (1996), 573 pp, VCH Publishers, Weinheim.
- [14] J. Detournay, M. Ghodsi, R. Dérie, *Etude cinétique de la formation de goethite par aération de gels d'hydroxyde ferreux*, Ind. Chim. Belg. **39** (1974) p. 695-701.
- [15] A.A. Olowe, J.M.R. Génin, *The mechanisms of oxidation of ferrous hydroxide in sulphated aqueous media : importance of the initial ratio of the reactants*, Corros. Sci. **32** (1991) p. 65-984.
- [16] Ph. Refait, J.M. Génin, *The oxidation of ferrous hydroxide in chloride-containing aqueous media and Pourbaix diagrams of Green Rust One*, Corros. Sci. **34** (1993) p. 797-819.
- [17] U. Schwertmann, H. Fechter, *The formation of green rust and its transformation to lepidocrocite*, Clay Miner. **29** (1994) p. 87-92.
- [18] R. Sabot, M. Jeannin, M. Gadouleau, Q. Guo, E. Sicre, Ph. Refait, *Influence of lactate ions on the formation of rust*, Corros. Sci. **49** (2007) p. 1610-1624.
- [19] K Stahl, K. Nielsen, J. Jiang, B. Lebech, J.C. Hanson, P. Norby, J. van Lanschot, *On the akaganéite crystal structure, phase transformations and possible role in post-excavational corrosion of iron artifacts*, Corros. Sci. **45** (2003) p. 2563-2575.

- [20] C. Rémazeilles, Ph. Refait, *On the formation of β -FeOOH (Akaganéite) in chloride-containing environments*, Corros. Sci. **49** (2007) p. 844-857.
- [21] Ph. Refait, J.M. Génin, *The mechanisms of oxidation of ferrous hydroxychloride β -Fe₂(OH)₃Cl in chloride-containing aqueous solution : the formation of β -FeOOH akaganeite ; an X-ray diffraction, Mössbauer spectroscopy and electrochemical study*, Corros. Sci. **39** (1997) p. 539-553.
- [22] C. Rémazeilles, Ph. Refait, *Formation, fast oxidation and thermodynamic data of Fe(II) hydroxychlorides*, Corros. Sci. **50** (2008) p. 856-864.
- [23] F.V. Chukhrov, B.B. Zvyagin, A.I. Gorshkov, L.P. Yermilova, V.V. Balashova, *Ferrihydrite*, Izv. Akad. Nauk. SSR Ser. Geol. **4** (1973) p. 23–33 (Traduit dans Int. Geol. Rev. **16** (1973) 1131–1143).
- [24] K.M. Towe, W.F. Bradley, *Mineralogical constitution of colloidal « hydrous ferric oxides »*, J. Coll. Interf. Sci. **24** (1967) p. 383-392.
- [25] Ph. Refait, M. Reffass, J. Landoulsi, R. Sabot, M. Jeannin, *Role of phosphate species during the formation and transformation of the Fe(II-III) hydroxycarbonate Green Rust*, Colloids and Surfaces A **299** (2007) p. 29-37.
- [26] Ph. Refait, O. Benali, M. Abdelmoula, J.-M. R. Génin, *Formation of “ferric green rust” and/or ferrihydrite by fast oxidation of iron(II-III) hydroxychloride green rust*, Corros. Sci. **45** (2003) p. 2435-2449.
- [27] R. Allman, *Doppelschichtstrukturen mit brucitähnlichen Schichtionen*, Chimia **24** (1970) p. 99-108.
- [28] H.F.W. Taylor, *Crystal structures of some double hydroxide minerals*, Mineral. Mag. **39** (1973) p. 377-389.
- [29] J.D. Bernal, D.R. Dasgupta, A.L. Mackay, *The oxides and hydroxides of iron and their structural inter-relationships*, Clay Miner. Bull. **4** (1959) p. 15-30.
- [30] Ph. Refait, M. Abdelmoula, J.-M. Génin, *Mechanisms of formation and structure of green rust one in aqueous corrosion of iron in the presence of chloride ions*, Corros. Sci. **40** (1998) p. 1547-1560.
- [31] L. Simon, M. François, Ph. Refait, G. Renaudin, M. Lelaurain, J.M.R. Génin, *Structure of the Fe(II-III) layered double hydroxysulphate green rust two from Rietveld analysis*, Solid State Sci. **5** (2003) p. 327-334.
- [32] P.P. Stampfl, *Ein basisches Eisen-II-III-Karbonat in Rost*, Corros. Sci. **9** (1969) p. 185-187.

- [33] H.C.B. Hansen, *Composition, stabilisation, and light absorption of Fe(II)-Fe(III) hydroxycarbonate (green rust)*, Clay Miner. **24** (1989) p. 663-669.
- [34] S.H. Drissi, Ph. Refait, M. Abdelmoula, J.M.R. Génin, *Preparation and thermodynamic properties of Fe(II)-Fe(III) hydroxide-carbonate (green rust one), Pourbaix diagram of iron in carbonate-containing aqueous media*, Corros. Sci. **37** (1995) p. 2025-2041.
- [35] I.R. McGill, B. McEnaney, D.C. Smith, *Crystal structure of green rust formed by corrosion of cast iron*, Nature **29** (1976) p. 200-201.
- [36] M. Abdelmoula, Ph. Refait, S.H. Drissi, J.-P. Mihé, J.-M.R. Génin, *Conversion electron Mössbauer spectroscopy and X-ray diffraction studies of the formation of carbonate-containing green rust one by corrosion of metallic iron in NaHCO₃ and (NaHCO₃ + NaCl) solutions*, Corros. Sci. **38** (1996) p. 623-633.
- [37] S. Savoye, L. Legrand, G. Sagon, S. Lecomte, A. Chaussé, R. Messina, P. Toulhoat, *Experimental investigations on iron corrosion products formed in bicarbonate/carbonate-containing solutions at 90°C*, Corros. Sci. **43** (2001) p. 2049-2064.
- [38] L. Legrand, G. Sagon, S. Lecomte, A. Chaussé, R. Messina, *A Raman and infrared study of a new carbonate green rust obtained by electrochemical way*, Corros. Sci. **43** (2001) p. 1739-1749.
- [39] J.-M.R. Génin, A.A Olowe, N.D. Benbouzid-Rollet, D. Prieur, M. Confente, B. Resiak, *The simultaneous presence of green rust 2 and sulphate reducing bacteria in the corrosion steel sheet piles in a harbour area*, Hyperfine Interact. **69** (1991) p. 875-878.
- [40] A.A. Olowe, A. Bauer, J.-M.R. Génin, J. Guézennec, *Mössbauer effect evidence of the existence of green rust 2 transient compound from bacterial corrosion in marine sediments*, Corrosion (NACE) **45** (1989) p. 229-234.
- [41] Ph. Refait, J.-B. Memet, C. Bon, R. Sabot, J.-M. R. Génin, *Formation of the Fe(II)-Fe(III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel*, Corros. Sci. **45** (2003) p. 833-845.
- [42] Ph. Refait, S.H. Drissi, J. Pytkiewicz, J.M. Génin, *The anionic species competition in iron aqueous corrosion : role of various green rust compounds*, Corros. Sci. **39** (1997) p. 1699-1710.
- [43] International Mineralogical Association, mineral number 2003-057.
- [44] F. Trolard, J.-M.R. Génin, M. Abdelmoula, G. Bourrié, B. Humbert, A.J. Herbillon, *Identification of a green rust mineral in a reductomorphic soil by Mössbauer and Raman spectroscopies*, Geochim. Cosmochim. Acta **61** (1997) p. 1107-1111.

- [45] J.M. Génin, G. Bourrié, F. Trolard, M. Abdelmoula, A. Jaffrezic, Ph. Refait, V. Maître, B. Humbert, A. Herbillon, *Thermodynamic Equilibria in Aqueous Solutions of Synthetic and Natural Fe(II) - Fe(III) Green Rusts ; Occurrences of the Mineral in Hydromorphic Soils*, Environ. Sci. Technol. **32** (1998) p. 1058-1068.
- [46] D. Rickard, G.W. Luther III, *Chemistry of iron sulfides*, Chemical Review **107** (2007) p. 514-562.
- [47] H. Ohfuji, D. Rickard, *High resolution transmission electron microscopic study of synthetic nanocrystalline mackinawite*, Earth Planet. Sci. Letters **241** (2006) p. 227-233.
- [48] J.A. Bourdiseau, M. Jeannin, R. Sabot, C. Rémaizeilles, Ph. Refait, *Characterisation of mackinawite by Raman spectroscopy: effects of crystallisation, drying and oxidation*, Corros. Sci. **50** (2008) p. 3247-3255.
- [49] D. Rickard, A. Griffith, A. Oldroyd, I.B. Butler, E. Lopez-Capel, D.A.C. Manning, D.C. Apperley, *The composition of nanoparticulate mackinawite, tetragonal iron(II) monosulfide*, Chemical Geology **235** (2006) p. 286-298.
- [50] L. Legrand, S. Savoye, A. Chausse, R. Messina, *Study of oxidation products formed on iron in solutions containing bicarbonate/carbonate*, Electrochim. Acta **46** (2000) p. 111–117.
- [51] T. Nishimura, J. Dong, *Corrosion behavior of carbon steel for overpack in groundwater containing bicarbonate ions*, Journal of Power and Energy Systems, **3** (2009) p. 23-30.
- [52] M. Saheb, D. Neff, Ph. Dillmann, H. Matthiesen, E. Foy, *Long-term corrosion behaviour of low-carbon steel in anoxic environment: Characterisation of archaeological artefacts*, J. Nuclear Materials (2008) p. 118-123.
- [53] M. Saheb, D. Neff, Ph. Dillmann, H. Matthiesen, “Long-term corrosion behaviour of low carbon steel in anoxic soils” in Metal07, Proceedings of the Interim Meeting of the ICOM-CC Metal WG, Amsterdam, September 2007, vol. 2, p. 69-75.
- [54] M. Schlegel, C. Bataillon, C. Blanc, D. Pret, E. Foy, *Anodic activation of iron corrosion in clay media under water-saturated conditions at 90°C : Characterization of the corrosion interface*, Environ. Sci. Technol. **44** (2010) p. 1503-1508.
- [55] D. Neff, P. Dillmann, L. Bellot-Gurlet, G. Beranger, *Corrosion of iron archaeological artefacts in soil: characterisation of the corrosion system*, Corros. Sci. **47** (2005) p. 515-535.
- [56] S. Reguer, Ph. Dillmann, F. Mirambet, L. Bellot-Gurlet, *Local and structural characterisation of chlorinated phases formed on ferrous archaeological artefacts by μ XRD and μ XANES*, Nucl. Instr. and Meth. In Phys. Res. B **240** (2005) p. 500-504.

- [57] C. Rémazeilles, D. Neff, F. Kergourlay, E. Foy, E. Conforto, E. Guilminot, S. Reguer, Ph. Refait, Ph. Dillmann, *Mechanisms of long-term anaerobic corrosion of iron archaeological artefacts in seawater*, Corros. Sci. **51** (2009) p. 2932-2941.
- [58] E. Antoine, L. Lemoine, Rapport final, C.N.E.X.O. (Centre National pour l'Exploitation des Océans) C.O.B. (Centre Océanologique de Bretagne), (1981).
- [59] L. Bousselmi, C. Fiaud, B. Tribollet, E. Triki, *Impedance spectroscopic study of a steel electrode in scaling and corrosion : interphase model*, Elect.Acta **44** (1999) P. 4357-4363.
- [60] R. Jeffrey, R.E. Melchers, *Bacteriological influence in the development of iron sulphide species in marine immersion environments*, Corros. Sci. **45** (2003) p. 693-714.
- [61] G. Ona-Nguema, C. Carteret, O. Benali, M. Abdelmoula, J.M. Génin, F. Jorand, *Competitive formation of hydroxycarbonate green rust 1 versus hydroxysulphate green rust 2 in Shewanella putrefaciens cultures*, Geomicrobiol. J. **21** (2004) p. 79-90.
- [62] A. Zegeye, G. Ona-Nguema, C. Carteret, L. Huguet, M. Abdelmoula, F. Jorand, *Formation of hydroxysulphate green rust 2 as a single iron(II-III) mineral in microbial culture*, Geomicrobiol. J. **22** (2005) p. 389-399.
- [63] W. B. Whitman, D. C. Coleman, W. J. wiebe, *Prokariotes : the unseen majority*, Proc. Natl. Acad. Sci. **95** (1998) p. 6578-6583.
- [64] M. S. Rappé, K. Vergin, S. J. Giovannoni, *Phylogenetic comparisons of a coastal bacterioplankton community with its counterparts in open ocean and freshwater systems*, FEMS Microbiol. Ecol. **33** (2000) p. 219–232.
- [65] S. J. Giovannoni, U. Sting, *Molecular diversity and ecology of microbial plankton*, Nature **437** (2005) p. 343–348.
- [66] C. Pedros-Alio, *Marine microbial diversity: can it be determined ?* Trends in Microbiology **14** (2006) p. 257-263.
- [67] A. Hagström, T. Pommier, F. Rohwer, K. Simu, W. Stolte, D. Svensson, A. L. Zweifel, *Use of 16S Ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species*, Appl. and Environ. Microbiol. **68** (2002) p. 3628-3633.
- [68] T. Pommier, J. Pinhassi, A. Hagström, *Biogeographic analysis of ribosomal RNA clusters from marine bacterioplankton*, Aquatic microbial Ecology **41** (2005) p. 79-89.
- [69] T. P. Curtis, J. W. Sloan, J. W. Scannell, *Estimating prokaryotic diversity and it's limits*, Proc. National Academy of sciences of the USA **99** (2002) p. 10494-10499.
- [70] B. J. Finlay, *Global dispersal of free-living microbial eukaryote species*, Science **296** (2002) p. 1061-1063.

- [71] T. Fenchel, *Cosmopolitan microbes and their “cryptic” species*, Aquatic microbial ecology **41** (2005) p. 49-54.
- [72] L. M. Prescott, J. P. Harley, D. A. Klein, *Microbiology*, 5th edition, (2003) De Boeck-University (Eds.) Bruxelles.
- [73] P. Caumette, *Développement des bactéries phototrophes et des bactéries sulfato-réductrices dans les lagunes peu profondes et des lagunes stratifiées. Etude de leur rôle dans le cycle du soufre et dans la production de biomasse*, Mémoire de Doctorat, Université d'Aix Marseille III (1985).
- [74] J. Leloup, L. Quillet, C. Oger, D. Boust, F. Petit, *Molecular quantification of sulfate-reducing microorganisms (carrying dsrAB genes) by competitive PCR in estuarine sediments*, Microbiol. Ecol. **47** (2004) p. 207-214.
- [75] J. Leloup, *Etude de la communauté microbienne sulfato-réductrice (portant le gène dsrAB) dans les vasières de l'estuaire de Seine*, Mémoire de doctorat de l'Université de Rouen (2004), p. 131.
- [76] I. B. Beech, C. C. Gaylarde, *Recent advances in the study of biocorrosion – an overview*, Microbiol. **30** (1999) p. 177-190.
- [77] D. Bermont-Bouis, M. Janvier, P. A. Grimont, I. Dupont, T. Vallaëys, *Both sulfate-reducing bacteria and Enterobacteriaceae take part in marine biocorrosion of carbon steel*, Appl. Microbiol. **102** (2007) p.161-168.
- [78] W. Lee, Z. Lewandowski, P.H. Nielsen, W. A. Hamilton, *Role of sulfate reducing bacteria in corrosion of mild steel : a review*, Biofouling **8** (1995) p. 165-194.
- [79] R.J. Gubner, *Biofilms and accelerated low-water corrosion of carbon steel piling in tidal waters*, PhD thesis, University of Portsmouth (1998).
- [80] J.E. Breakell, M. Siegwart, K. Foster, D. Marshall, M. Hodgson, R. Cottis, S. Lyon, *Management of accelerated low water corrosion in steel maritime structures*, CIRIA C634 (Eds.), London (2005).
- [81] A. Pedersen, M. Hermanson, *Bacterial corrosion of iron in seawater in situ and in aerobic and anaerobic model systems*, FEMS Microbiology Ecology **86** (1991) p. 139-148.
- [82] C. Knoblauch, B. B. Jorgensen, J. Harder, *Community size and metabolic rates of psychrophilic sulfate-reducing bacteria in arctic marine sediments*, Appl. Environ. Microb. **65** (1999) p. 4230-4233.

- [83] F. Widdel, *Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria*. Biology of anaerobic microorganisms, Chap. 10, p. 469-585. A.J.B. Zehnader, J. Wiley & Sons (Eds.) London, (1988).
- [84] F. Widdel, F. Bak, *Gram negative mesophilic sulfate-reducing bacteria*, « The prokaryotes » 2nd edition, (1992) p. 3354-3378.
- [85] T.A. Hansen, *Metabolism of sulfate-reducing prokaryotes*. Ant. Van. Leeuw. 66 (1994) 165-185.
- [86] J. Pelmont, *Bactéries et environnement - Adaptations physiologiques*. 2ème édition, (1993).
- [87] A. Le Faou, B. S. Rajagopal, L. Daniels, G. Fauque, *Thiosulfate, polythionates and elemental sulfur assimilation and reduction in the bacterial world*, FEMS Microbiol. Rev., **75** (1990) p. 351-382.
- [88] J. L. Garcia, B. K. C. Patel, M. L. Fardeau, G. Ravot, M. Magot, J. L. Cayol, B. Ollivier, *Thiosulfate reduction by non-sulfate-reducing anaerobic prokaryotes*, Recent research developments in microbiology, **4** (2000) p. 701-724.
- [89] G. Ravot, B. Ollivier, M. Magot, B. K. C. Patel, J. L. Crolet, M. L. Fardeau, J. L. Garcia, *Thiosulfate reduction : an important physiological feature shared by members of thermotogales*, Appl. Environn. Microbiol., **61** (1995) p. 2053-2055.
- [90] M. Magot, G. Ravot, X. Campaignolle, B. Ollivier, B. K. C. Patel, M. L. Fardeau, P. Thomas, J. L. Crolet, J. L. Garcia, *Dethiosulfovibrio peptidovorans* gen. Nov., SP. Nov., a new anaerobic, slightly halophilic, thiosulfate-reducing bacterium from corroding offshore oil wells *International, Journal of systematic bacteriology*, **47** (1997) p. 818-824.
- [91] M.-L. Fardeau, J.-L. Cayol, M. Magot, B. Ollivier, *Hydrogen Oxidation Abilities in the Presence of Thiosulfate as Electron Acceptor Within the Genus Thermoanaerobacter* Current Microbiology **29** (1994) p. 269-272.
- [92] F. Widdel, N. Pfennig, *Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. I- Isolation of new sulfate-reducing bacteria enriched with acetate from saline environments. Description of Desulfobacter postgatei* gen. nov., sp. nov. Arch. Microbiol. **129** (1981) p. 395-400.
- [93] J.F. Imhoff, P. Caumette, *Recommended standards for the description of new species of anoxygenic phototrophic bacteria*. Int J Syst Evol Microbiol. **54** (2004) 1415-21.
- [94] J.R. Postgate, *Economic importance of sulphur bacteria*, Phil. Trans. R. soc. Lond. **B298** (1982) p. 583-600.

- [95] K.L. Straub, M. Benz, B. Schink, *Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH*. FEMS Microbiology Ecology **34** (2001) p. 181-186.
- [96] K.B. Hallberg, D.B. Johnson, *Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters*. Hydrometallurgy **71** (2003) p. 139-148.
- [97] D.B. Johnson, N. Okibe, F.F. Roberto, *Novel thermo-acidophilic bacteria isolated from geothermal sites in Yellowstone National Park: physiological and phylogenetic characteristics*. Archives of microbiology **180** (2003) p. 60-68.
- [98] A.I. Lopez-Archilla, E. Gérard, D. Moreira, P. Lopez-Garcia, *Macrofilamentous microbial communities in the metal-rich and acidic River Tinto, Spain*. FEMS Microbiology Ecology **235** (2004) p. 221-228.
- [99] N. Duongruitai, A. D. Warren, O. H. Tuovinen, *Microbial populations identified by fluorescence in situ hybridization in a constructed wetland treating acid coal mine drainage*. Journal of environmental quality **35** (2006) p. 1329-1337.
- [100] H.A. Videla, *Manual of biocorrosion*, CRC Lewis Publishers (Eds.) (1996).
- [101] A.A. Bilgin, L. Silverstein, L.D. Jenkins, *Iron respiration by Acidiphilium cryptum at pH 5*. FEMS Microbiology Ecology, **49** (2004) p. 137-143.
- [102] A. Ehrenreich, F. Widdel, *Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism*. Applied and Environmental Microbiology **60** (1994) p. 4517-4526.
- [103] M. Benz, A. Brune, B. Schink. *Anaerobic and aerobic oxidation of ferrous iron at neutral pH by chemoheterotrophic nitrate-reducing bacteria*. Archives of Microbiology **169** (1998) p. 159-165.
- [104] D.R. Lovley, *Dissimilatory Fe(III)- and Mn(IV)-Reducing Prokaryotes*. Prokaryotes **2** (2006) p. 635-658.
- [105] D.R. Lovley, *Organic matter mineralization with the reduction of ferric iron: a review*. Geomicrobiology Journal **5** (1987) p. 375-399.
- [106] D.J. Lonergan, H.L. Jenter, J.D. Coates, E.J. Phillips, T.M. Schmidt, D.R. Lovley, *Phylogenetic analysis of dissimilatory Fe(III)-reducing bacteria*, J. Bacteriol. **178** (1996) p. 2402-2408.
- [107] F. Caccavo Jr, B. Frolund, F. Van Ommen Kloeke, P.H. Nielsen, *Deflocculation of Activated Sludge by the Dissimilatory Fe(III)-Reducing Bacterium Shewanella alga BrY*, Appl. Environ. Microbiol. **62** (1996) p. 1487-1490.

- [108] AK. Lee, D.K. Newman, *Microbial iron respiration : impact on corrosion processes*, Appl. Microbiol. Biotechnol. **62** (2003) p.134-139.
- [109] D. Sigeo, *Microbial diversity and freshwater ecosystems*. In *Freshwater Microbiology: biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment*, 1-43. John Wiley & Sons, LTD (2005).
- [110] R. Kolter, E. P. Greenberg, *The superficial life of microbes*. Nature **441** (2006) p. 300-302.
- [111] J.W. Costerton, G.G. Geesey, K.J. Cheng, *How bacteria stick*. Scientific American **238** (1978) p. 86-95.
- [112] H.C. Flemming, *Biofilm*. In *Biodétérioration des matériaux*, G. Lemaître, N. Pébère, D. Festy (Eds.) EDP Sciences, (1995) chap. 5 p.71 -88.
- [113] R. Belas, M. Simon, M. Silverman, Regulation of lateral flagella gene transcription in *Vibrio parahaemolyticus*. Journal of Bacteriology **167** (1986) p. 210-218.
- [114] D.G. Davies, A.M. Chakrabarty, G.G. Geesey, *Exopolysaccharide production in biofilms: Substratum activation of alginate gene expression by Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. **59** (1993) p. 1181-1186.
- [115] D. De Beer, P. Stoodley, *Microbial biofilms*, Prokaryotes **1** (2006) p. 904-937.
- [116] H.C. Flemming, *Reverse osmosis membrane biofouling*, Experimental Thermal and Fluid Science **14** (1997) p. 382-391.
- [117] P. Stoodley, K. Sauer, D. G. Davies, J. W. Costerton, *Biofilms as complex differentiated communities*. Annual Reviews of Microbiology **56** (2002) p. 187-209.
- [118] A. Aguilera, *Development and structure of eukaryotic biofilms in an extreme acidic environment, rio tinto (SW, Spain)*. Microb Ecol. **53** (2007) p. 294-305.
- [119] K.C. Marshall, *Mechanisms of bacterial adhesion at solidwater interfaces*, in *Bacterial Adhesion*, DC Savage, M. Fletcher, (Eds.), New York (1985).
- [120] H. Dang, C. R. Lovell, *Bacterial Primary Colonization and Early Succession on Surfaces in Marine Waters as Determined by Amplified rRNA Gene Restriction Analysis and Sequence Analysis of 16S rRNA Genes*, Appl. Environ. Microbiol. **66** (1999) p. 467-475.
- [121] J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, H. M. Lappin-Scott, *Microbial biofilm*, Annu. Rev. Microbiol. **49** (1995) p. 711-45.
- [122] M. R. Parsek, E. P. Greenberg, *Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms*, Trends Microbiol. **13** (2005) p. 27-33.
- [123] D. De Beer, P. Stoodley, Z. Lewandowski, *Effect of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport*, Biotechnol. Bioeng. **43** (1994) p. 1131-1138.

- [124] H. A. Videla, L. K. Herrera, *Microbiologically influenced corrosion : looking to the future*, International microbiology, **8** (2005) p. 169-180.
- [125] Z. Lewandowski, P. Stoodley, F. Roe, *pH and polarized metal surfaces : theory, measurement and implication for MIC*, Microbially influenced corrosion and biodeterioration, (1990) N. J. E. Dowling, M. W. Mittelman, J.C. Danko (Eds.).
- [126] P. S. Stewart, M. J. Franklin, *Physiological heterogeneity in biofilms*, Nature **6** (2008) p. 199-210.
- [127] Z. Lewandowski, P. Stoodley, F. Roe, *Internal mass transport in heterogeneous biofilms*, *Recent advances*, Corrosion **95** (1995) paper No.222, NACE International, Houston, TX, USA.
- [128] H.A. Videla, *Corrosion of mild steel induced by sulfate reducing bacteria - a study of passivity breakdown by biogenic sulfides*, « Biologically Induced Corrosion », S.C. Dexter (Ed.), Houston, USA, NACE (1986).
- [129] X. Campagnolle, *Etude des facteurs de risque de la corrosion bactérienne des aciers au carbone induite par les bactéries sulfurogènes*, Thèse, Institut National Polytechnique de Toulouse (1996).
- [130] N. Montfort-Moros, *Corrosion localisée des aciers au carbone induite par des bactéries sulfato-réductrices. Développement d'un capteur spécifique*, Thèse, Université de Paris VI (2001).
- [131] W.A. Hamilton, *Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: a unifying electron transfer hypothesis*, Biofouling **19** (2003) p. 65-76.
- [132] K.Y. Chen, J.C. Morris, *Kinetics of oxidation of aqueous sulfide by O₂*, Environ. Sci. & Technol. **6** (1972) p. 529-537.
- [133] D.J. O'Brien, F.B. Birkner, *Kinetics of oxygenation of reduced sulphur species in aqueous solution*, Environ. Sci. & Technol. **11** (1977) p. 1114-1120.
- [134] J.L. Crolet, S. Daumas, M. Magot, *pH regulation by sulphate reducing bacteria*, Corrosion **93**, paper N° 303, NACE, Houston, USA.
- [135] R.D. Bryant, W.J. Jansen, J. Boivin, E.J. Laishley, W. Costerton, *Effect of hydrogenase and mixed sulfate reducing bacterial population on the corrosion of steel*, Appl. Environ. Microbiol. **57** (1991) p. 2804-2809.
- [136] S. Da Silva, R. Basséguy, A. Bergel, *The role of hydrogenases in the anaerobic microbiologically influenced corrosion of steels*, Bioelectrochemistry **56** (2002) p. 77-79.

- [137] S. Da Silva, R. Basséguy, A. Bergel, *Electron transfer between hydrogenase and 316L stainless steel: identification of a hydrogenase-catalyzed cathodic reaction in anaerobic MIC*, J. Electroanal. Chem. **561** (2004) p. 93-102.
- [138] M. Mehanna, R. Basseguy, M.-L. Delia, L. Girbal, M. Demuez, A. Bergel, *New hypotheses for hydrogenase implication in the corrosion of mild steel*, Electrochim. Acta **54** (2008) p. 140-147.
- [139] D.R. Bond, D.R. Lovley, *Electricity production by Geobacter sulfurreducens attached to electrodes*, Appl. Environ. Microbiol. **69** (2003) p. 1548–1555.
- [140] C. Dumas, R. Basseguy, A. Bergel, *DSA to grow electrochemically active biofilms of Geobacter sulfurreducens*, Electrochim. Acta **53** (2008) p. 3200–3209.
- [141] C. Dumas, R. Basseguy, A. Bergel, *Electrochemical activity of Geobacter sulfurreducens biofilms on stainless steel anodes*, Electrochim. Acta **53** (2008) p. 5235–5241.
- [142] M. Mehanna, R. Basseguy, M.-L. Delia, A. Bergel, *Effect of Geobacter sulfurreducens on the microbial corrosion of mild steel, ferritic and austenitic stainless steels*, Corros. Sci. **51** (2009) p. 2596-2604.
- [143] W.P. Iverson, G.J. Olson, L.F. Herverly, *The role of phosphorous and hydrogen sulfide in the anaerobic corrosion of iron and the possible detection of this corrosion by an electrochemical noise technique*, in « Biologically Induced Corrosion », S.C. Dexter (Ed.), Houston, USA, NACE (1986).
- [144] R.D. Bryant, E.J. Laishley, *The effect of inorganic phosphate and hydrogenase on the corrosion of mild steel*, Appl. Microbiol. Biotechnol. **38** (1993) p. 824-827.
- [145] L. De Silva Muñoz, A. Bergel, R. Basséguy, *Role of the reversible electrochemical deportation of phosphate species in anaerobic biocorrosion of steels*, Corros. Sci. **49** (2007) p. 3988-4004.
- [146] I.B. Beech, J.A. Sunner, K. Hiraoka, *Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes*, International Microbiology **8** (2005) p. 157-168.
- [147] I.B. Beech, V. Zinkevich, R. Tapper, R. Gubner, *Direct involvement of an extracellular complex produced by a marine sulphate reducing bacterium in deterioration of steel*, Geomicrobiol J. **15** (1998) p. 119-132.
- [148] G.G. Geesey, L. Jang, J.G. Jolley, M.R. Kankings, T. Iwaoka, *Binding of metal ions by extracellular polymers of biofilm bacteria*, Water Sci. Technol. **20** (1988) p. 161-165.

- [149] Ph. Refait, M. Abdelmoula, J.-M. Génin, R. Sabot, *Green rusts in electrochemical and microbially influenced corrosion of steel*, C.R. Geosciences **338** (2006) p. 476- 487.
- [150] J. Duan, S. Wu, X. Zhang, G. Huang, M. Du, B. Hou, *Corrosion of carbon steel influenced by anaerobic biofilm in natural seawater*, Electrochim. Acta **54** (2008) p. 22-28.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Ce chapitre va présenter l'ensemble des matériaux, méthodes et techniques mises en œuvre pour traiter les différents aspects de l'étude. La biocorrosion étant à l'interface de multiples domaines, différentes disciplines seront impliquées : la microbiologie, la biologie moléculaire, la physicochimie mais aussi les techniques spectroscopiques de caractérisations.

Le site portuaire d'expérimentation sera d'abord présenté ainsi que la mise en place des échantillons in situ puis le matériel utilisé lors de l'expérimentation. Ce chapitre abordera ensuite les méthodes d'analyses, avec dans un premier temps la stratégie d'échantillonnage mise en place pour récupérer les coupons métalliques ainsi que le matériel biologique dans des conditions optimales. Les techniques propres à la physicochimie (synthèse de rouilles vertes, synthèse de couches de rouilles), ainsi que celles de caractérisation structurales (micro-spectroscopie Raman, diffraction des rayons X et microscopie électronique à balayage) seront ensuite présentées, puis celles caractéristiques de la microbiologie (milieux, conditions, marquage et observation en épifluorescence) et enfin les méthodes plus particulières de biologie moléculaire seront exposées.

I. Site d'expérimentation et matériel

I.1. Site d'expérimentation et installation des coupons

Afin d'étudier les interactions entre les espèces du fer et les micro-organismes, des coupons d'acier ont été immergés en eau de mer naturelle sur le site portuaire des Minimes de La Rochelle (port de plaisance). Pour cela, un ponton dédié sur lequel un système d'immersion des échantillons a été développé au cours de la thèse de J.B. Memet en 1998 [1] a été mis à la disposition du laboratoire. Le système utilisé (figure 2.1) permet aux échantillons de rester constamment immergés (le ponton suivant la variation de la marée) sans être en contact avec les zones de boues. La plate forme est instrumentée de façon à permettre des mesures électrochimiques, notamment celle du potentiel des coupons, mais cela n'a pas été envisagé dans le cadre de ce travail de thèse.

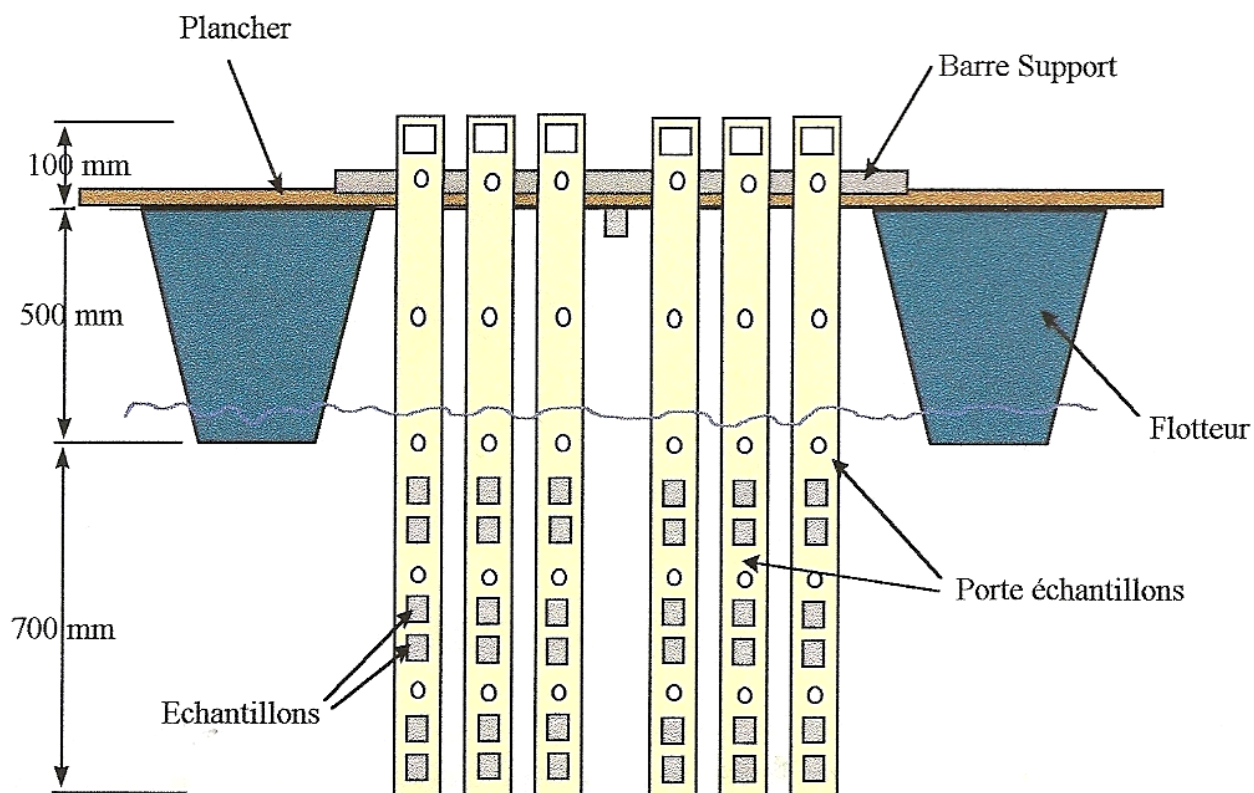


Figure 2.1 : Schéma de la plate-forme instrumentée

La figure 2.2 présente le schéma du système de fixation des coupons métalliques. Ces derniers (1) sont fixés sur des plaques en altuglass ($1300 \times 100 \times 6$ mm) (0), chimiquement inertes, à l'aide de diabolos (2). L'ensemble du système de fixation (diabolos (2) – boulons (3)) est préparé en polyamide afin d'éviter les couplages galvaniques. De plus, la forme des diabolos a été étudiée pour limiter les zones de confinement qui peuvent induire des phénomènes de corrosion caverneuse.

du

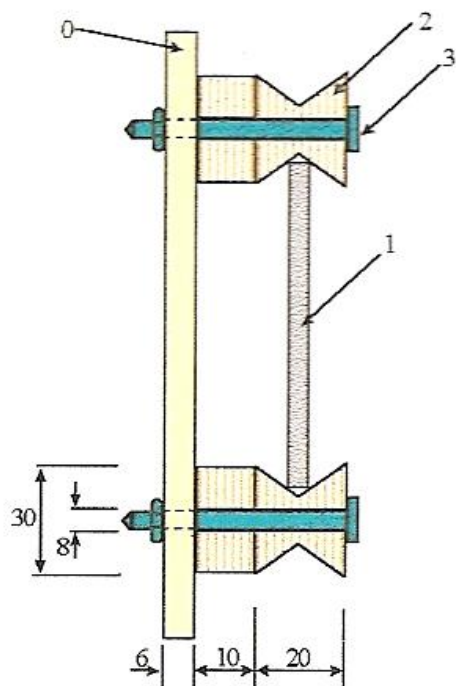


Figure 2.2 : Schéma du système de fixation coupon métallique (mesures en mm)

I.2. Coupons métalliques et électrodes de travail : composition et préparation

L'acier utilisé pour ces expérimentations est l'acier non allié E24, dont la dénomination provient de la norme NF A 35-501, désignant la résistance à la traction ou la limite élastique et correspondant à une limite minimale de 240 mégapascals. Cet acier de par sa composition chimique, s'apparente à l'acier normalisé S240GP (Euronorme EN 10248) utilisé dans la fabrication des palplanches. Sa composition chimique est donnée dans le tableau 2.1 ci dessous :

C	Si	Mn	P	S	Cr	Mo	Ni	Cu	Fe
0,122	0,206	0,641	0,016	0,131	0,118	0,02	0,105	0,451	98,19

Tableau 2.1 : Teneur (pourcentage massique) des principaux éléments de l'acier E24 [1]

Deux types de coupons, dans les deux cas des plaques carrées, ont été mis en œuvre pour la partie dépôt en eau de mer, le premier de dimensions 70×70×6 mm et le second de

dimensions 35×35×6 mm. Ces coupons ont été sablés avec des grains de granulométrie 20-30 mm afin d'enlever la couche de calamine et d'accélérer les phénomènes de corrosion.

Le même acier a été utilisé pour les expériences électrochimiques en laboratoire. Dans ces expériences, où l'objectif était de provoquer la formation de la rouille verte par polarisation anodique, des barres d'acier E24 ont été utilisées pour constituer des électrodes cylindriques. Les cylindres d'acier sont enrobés dans une résine (Mécaprex) afin de n'exposer qu'une seule face à l'électrolyte. La surface active est alors de l'ordre de 2 cm². Cette surface est polie juste avant le début de l'expérience sur des papiers abrasifs en carbure de silicium de grades 320 (46 µm) puis 600 (26 µm). Les électrodes sont ensuite rincées à l'eau milli-Q et immédiatement séchées pour limiter les phénomènes de corrosion.

I.3. Milieux, conditions de cultures et bactérie modèle

I.3.1 Milieux de culture :

Durant les différentes expérimentations, plusieurs milieux spécifiques ont été utilisés :

- i) Milieu Marine Broth de marque DIFCO®. Le mélange est prêt à l'usage (tableau 2.2). Le pH du milieu est ajusté à 7,6.

Composés	Quantité
Peptone	5 g
Extrait de levure	1 g
Citrate de fer $C_6H_5FeO_7 \cdot nH_2O$	0,10 g
Chlorure de sodium NaCl	19,45 g
Chlorure de magnésium $MgCl_2$	5,9 g
Sulfate de magnésium $MgSO_4$	3,24 g
Chlorure de calcium $CaCl_2$	1,8 g
Chlorure de potassium KCl	0,55 g
Hydrogénocarbonate de sodium $NaHCO_3$	0,16 g
Bromure de potassium BrK	0,08 g
Chlorure de strontium SrCl	34 mg
Acide borique H_3BO_3	22 mg
Silicate de sodium Na_2SiO_3	4 mg
Fluorure de sodium FNa	2,4 mg
Nitrate d'ammonium NH_4NO_3	1,6 mg
Hydrogénophosphate disodique Na_2HPO_4	8 mg
Eau distillée	qsp 1 L

Tableau 2.2 : Composition du milieu Marine Broth

- ii) Eau de mer artificielle (EDMA) :
NaCl : 23,4 g ; Chlorure de potassium : 1,5 g ; Sulfate de magnésium heptahydraté : 1,2 g ; Chlorure de calcium dihydraté : 0,15 g ; Chlorure de calcium : 1,5 g ; H₂O qsp 1 L.
- iii) Milieu Baar modifié pour réducteurs de sulfates. Différentes solutions doivent préalablement être préparées (tableau 2.3).

Solution	Composés	Quantité
1	Sulfate de magnésium MgSO ₄ Citrate de sodium Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ Sulfate de calcium dihydraté CaSO ₄ · 2H ₂ O Chlorure d'ammonium NH ₄ Cl Chlorure de sodium NaCl Eau distillée	2 g 5 g 1 g 1 g 25 g 400 mL
2	Hydrogénophosphate di-potassium K ₂ HPO ₄ Eau distillée	0,5 g 200 mL
3	Lactate de sodium (à 60%) NaC ₃ H ₅ O ₃ Extrait de levure Eau distillée	3,5 g 1 g 400 mL
4	Sulfate d'ammonium ferreux Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ Eau distillée	5 g 100 mL

Tableau 2.3 : Composition des solutions servant à la préparation du milieu Baar modifié pour la croissance des bactéries sulfato-réductrices (BSR)

Le pH des solutions 1, 2 et 3 est ajusté à 7,5 puis les solutions sont stérilisées à l'autoclave à 115°C pendant 20 minutes avant d'être mélangées. La solution 4 est stérilisée par filtration (filtre Millipore 0,22 µm) et ajoutée extemporanément à 2 % (v/v) en volume final.

- iv) Milieux Starkey modifiés :
Le milieu Starkey, décrit dans [2], a été modifié afin de contrôler l'apport en sulfate et Fe²⁺. Les compositions des milieux Starkey modifié et Starkey modifié sans sulfates sont décrites dans les tableaux 2.4 à 2.6. Afin de remplacer l'extrait de levure, préconisé initialement, mais de composition variable, une solution de vitamines [3] et une solution d'oligo-éléments [3] ont été rajoutées. Lors de la préparation du milieu

Starkey modifié sans sulfates, les sources de sulfates provenant de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et Na_2SO_4 sont alors remplacées par $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, permettant de conserver l'apport de fer.

Le pH du milieu est ajusté à 7,5 avant stérilisation à l'autoclave à 115°C pendant 20 minutes. Le pH de la solution de vitamines est ajusté à 7. Les solutions de vitamines et d'oligo-éléments sont filtrées (filtre MILLEX®GV millipore $0,22 \mu\text{m}$ Durapore® membrane PVDF) et ajoutées extemporanément.

Produit	Quantité
NH_4Cl	1g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2g
Na_2SO_4	4g
Lactate de sodium 50 %	5,4g
K_2HPO_4	0,5g
Acide ascorbique	0,1g
NaCl	30g
Solution d'oligo-éléments	1mL
Solution de vitamines	1mL
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,28 mg
Eau distillée	QSP 1L

Tableau 2.4 : Composition du milieu Starkey modifié, avec en vert les éléments supprimés pour le milieu Starkey modifié sans sulfates et en bleu les solutions ajoutées d'oligo-éléments et de vitamines, qui remplacent l'extrait de levure

Solution de vitamines	
Produit	Quantité
Vitamine B12	1mg
d-(+)-biotine	20mg
Acide folique	20mg
Acide nicotinique	50mg
Acide p-aminobenzoïque	50mg
Calcium d-(+)-pantothenate	50mg
Pyridoxine HCl	100mg
Riboflavine	50mg
Thiamine	50mg
Acide thioctique	50mg
Eau distillée	QSP 1L
Ajustement du pH à 7	

Tableau 2.5 : Composition de la solution de vitamines [3]

Solution d'oligo-éléments	
Produit	Quantité
HCl 32 %	53,3mL
MgO	10,75g
CaCO ₃	1g
C ₆ H ₁₁ FeNO ₇	6g
ZnCl ₂	1,44g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,224g
CuCl ₂ .2H ₂ O	0,05g
CoCl ₂	0,18g
H ₃ BO ₃	0,06g
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,06g
NiCl ₂ .6H ₂ O	0,1g
Na ₂ SeO ₃	0,06g
Eau distillée	QSP 500 mL

Tableau 2.6 : Composition de la solution d'oligo-éléments [3-4]

- iv) Milieu LB (Lysogeny Broth). Il est constitué de :
NaCl : 10 g ; Tryptone : 10 g ; extrait de levure : 5 g ; H₂O qsp 1 L

Les milieux gélosés ont été réalisés en ajoutant 12g/L d'agar. D'autre part, tous les milieux sont stérilisés à l'autoclave à 115°C durant 20 minutes. Afin de désaérer les milieux utilisés en anaérobiose, ceux-ci ont été ensuite chauffés à 100°C pendant 10 minutes dans un bain thermostaté puis placés dans l'enceinte d'anaérobiose durant 24 heures avant d'être utilisés.

I.3.2 Bactérie de référence :

La souche bactérienne de référence utilisée est issue de la collection American Type Culture (ATCC) dont le numéro 29578 fait référence à *Desulfovibrio desulfuricans* subsp.

aestuarii. C'est un bacille à Gram négatif, anaérobie strict, et qui possède la capacité de réduire les sulfates présents dans le milieu pour assurer son métabolisme énergétique.

II. Méthodes

II.1. Méthodes de prélèvements

Afin d'éviter d'une part l'oxydation des produits de corrosion du fer à base de Fe(II), très réactifs vis-à-vis de l'oxygène, et d'autre part la contamination de l'échantillon, il a été nécessaire de définir une stratégie de prélèvement rigoureuse.

Lors du prélèvement des coupons, un récipient fermé hermétiquement (préalablement stérilisé à l'alcool à 70°) est d'abord rempli avec de l'eau de mer du site afin de conserver l'échantillon jusqu'au dernier moment dans les conditions du milieu. Les coupons sont ensuite décrochés de leur support tout en étant maintenus immergés, puis transférés dans le récipient. Les échantillons sont ensuite transportés au laboratoire afin de réaliser les premiers traitements le jour même.

Toutes les manipulations des coupons ont été réalisées avec des gants en latex.

II.2. Stades de prélèvements et répartition des échantillons

Les coupons métalliques ont été prélevés respectivement après 1 semaine, 2 semaines, 1 mois et 2 mois pour les stades considérés « précoces » de corrosion, et après 11 ans d'immersion pour les coupons étudiés dans le cas d'un stade avancé de corrosion.

Lors de chaque prélèvement, quatre coupons ont été récupérés :

Deux de dimensions 70x70x6 mm : l'un permet de réaliser les analyses microbiologiques en aérobiose, le second est utilisé pour les analyses microbiologiques en anaérobiose et les analyses en micro-spectroscopie Raman.

Deux de dimensions 35x35x6 mm : ils sont utilisés afin d'extraire l'ADN total pour les tests en TTGE (Temperature Time Gel Electrophoresis). Les prélèvements réalisés sur ces coupons sont conservés à -20°C dans l'attente d'analyses ultérieures.

II.3. Extraction des micro-organismes

Coupons 70x70x6 mm : que ce soit en aérobiose ou anaérobiose, ces échantillons ont subi le même traitement consistant en un décapage mécanique à l'aide d'un scalpel stérile. La matière décrochée est ensuite mise en suspension dans 2 mL d'eau de mer artificielle puis pesée, les tubes contenant l'EDMA ayant été préalablement tarés. Ces prélèvements sont ensuite broyés à l'aide de billes de verre (diamètre 4 mm) pendant 1 minute au vortex afin de disloquer les amas. Ces échantillons serviront par la suite pour : les ensemencements destinés à l'estimation et à l'étude de la flore cultivable, l'estimation de la flore totale par coloration au DAPI (DiAmine Phosphate Indol), et l'ensemencement des enrichissements destinés à l'étude en biologie moléculaire par TTGE.

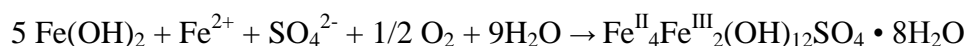
Coupons 35x35x6 mm : Ces coupons sont décapés mécaniquement à l'aide d'un scalpel stérile, puis pesés dans un flacon stérile et enfin congelés à -20°C en attendant l'extraction de l'ADN.

II.4. Synthèse de la rouille verte sulfatée, $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$

L'hydroxysulfate de fer(II)-fer(III) de type rouille verte $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$ peut être synthétisé par oxydation d'un précipité d'hydroxyde ferreux en solution aqueuse [4-6]. La méthode la plus simple consiste à précipiter $\text{Fe}(\text{OH})_2$ à partir d'une solution de soude NaOH et d'une solution de sulfate ferreux $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ [4, 5]. Une méthode alternative a été développée pour mieux correspondre au processus de formation de la rouille verte sulfatée en milieu marin [6]. Elle consiste à utiliser le chlorure ferreux $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ pour obtenir $\text{Fe}(\text{OH})_2$ puis à ajouter une solution de Na_2SO_4 juste après la précipitation pour fournir les ions SO_4^{2-} nécessaires à l'obtention de la rouille verte sulfatée. Les concentrations suivantes ont été utilisées :

$[\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}] = 0,54 \text{ mol/L}$, $[\text{NaOH}] = 0,90 \text{ mol/L}$ et $[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 0,09 \text{ mol/L}$

L'obtention d'une rouille verte nécessite un excès de fer(II) [4] de sorte qu'un rapport initial $[\text{Fe}^{2+}] / [\text{OH}^-]$ supérieur ou égal à 0,6 convient. Pour le cas particulier de notre étude, le rapport $[\text{Fe(II)}]$ sur $[\text{SO}_4]$ a été fixé à 6, ce qui permet l'incorporation au sein de la rouille verte de la quasi-totalité des sulfates, en vertu de la réaction suivante, qui décrit la formation de la rouille verte à partir de $\text{Fe}(\text{OH})_2$:



L'homogénéité de l'oxydation et l'aération de la solution sont assurées par une agitation vigoureuse et contrôlée (barreau magnétique tournant à 760 tr/min) du précipité. La température est fixée à 25°C via un bain thermostaté. Le suivi au cours du temps de l'oxydation de la suspension aqueuse aérée s'effectue via la mesure du potentiel d'électrode E . Celui-ci est mesuré au moyen d'une électrode de métal inerte à fil de platine et d'une électrode de référence au calomel saturée. Une fois la rouille verte obtenue, événement indiqué par une variation rapide de E [4-6], le précipité est transvasé en bouteille et le milieu Starkey modifié (avec ou sans sulfates) est ajouté. La solution ainsi obtenue est alors chauffée à 80°C et désaérée à l'argon (1,7 bar) pendant une heure, puis la bouteille est fermée hermétiquement afin d'éviter tout échange gazeux avant l'entrée dans l'enceinte d'anaérobiose.

II.5. Synthèse de couches de rouille modèle

La compréhension des systèmes de corrosion implique le développement en laboratoire de systèmes modèles aussi représentatifs que possible des phénomènes se déroulant sur sites naturels. Pour ce faire, il est indispensable d'être capable de reconstituer les couches de produits de corrosion observées sur ces sites. Ces couches de produits de corrosion ont été réalisées par oxydation du substrat acier sous polarisation anodique.

Pour ces expériences électrochimiques, le système utilisé est composé d'une cellule à simple compartiment d'une contenance de 500 mL, équipée d'un montage à trois électrodes connectées à un potentiostat PGP 201 (Radiometer Analytical). Le contrôle et l'acquisition des données sont pilotés par un ordinateur. Nous avons utilisé :

- une électrode de référence au calomel saturée en KCl (ECS) ($E = 241$ mV/ESH à 20°C), afin d'exprimer les potentiels par rapport à cette référence,
- une électrode auxiliaire en platine de grande dimension placée en face de l'électrode de travail pour favoriser la régularité des lignes de courant, et
- une électrode de travail en acier E24, dont la préparation a été décrite en section I.2.

L'électrode est positionnée de sorte que sa surface soit horizontale et tournée vers le haut.

Plusieurs électrolytes ont été considérés. Leur composition est décrite dans le tableau 2.7.

:

Solution	Concentration (mol/L)		
	NaHCO ₃	Na ₂ SO ₄	NaCl
Mélanges sulfate et bicarbonate	0,03	0,3	-
	0,03	0,03	-
	0,003	0,03	-
Eau de mer simplifiée	0,003	0,03	0,5

Tableau 2.7 : Electrolytes considérés pour l'étude de la formation de la rouille verte sulfatée par polarisation anodique d'électrodes d'acier

L'objectif principal était de faire croître sur une surface d'acier une couche de rouille verte sulfatée similaire à celle se formant en milieu marin et d'étudier le phénomène. Nous souhaitons aussi comprendre pourquoi la variété sulfatée des rouilles vertes se formait préférentiellement à la rouille verte carbonatée, en principe plus stable [7]. Nous avons choisi pour simplifier de travailler avec des électrolytes constitués uniquement de sels de sodium. Pour l'électrolyte baptisé dans le tableau 2.7 « eau de mer simplifiée », nous avons choisi des concentrations voisines de celles caractéristiques de l'eau de mer. Les rapports des concentrations $[Cl^-]/[SO_4^{2-}]$ (= 16,6) et $[SO_4^{2-}]/[HCO_3^-]$ (= 10) sont en particulier du même ordre de grandeur que ceux de l'eau de mer (19 et 12 selon [8]). Le pH de cet électrolyte, de valeur moyenne 7,95, s'apparente également à celui de l'eau de mer. Par exemple, notons que le pH de l'eau de mer artificielle définie par la norme ASTM D1141 est ajusté à 8,2. Enfin, pour étudier le rôle de la concentration en carbonate et du rapport $[SO_4^{2-}]/[HCO_3^-]$, trois électrolytes constitués à partir des sels Na₂SO₄ et NaHCO₃ ont été utilisés.

Avant chaque expérience, les solutions sont désaérées via un flux d'argon pendant 30 minutes. L'électrode d'acier est ensuite introduite dans ce réacteur. Pendant la polarisation, le flux d'argon est maintenu, la température n'est pas contrôlée et l'électrolyte n'est pas agité. Néanmoins, le flux d'argon, via les bulles qui circulent dans l'électrolyte, provoque une agitation de celui-ci. Certaines expériences ont été effectuées dans une boîte à gants sous atmosphère d'argon ; la teneur en oxygène de cette atmosphère est inférieure à 2 ppm. Dans ce cas là, l'électrolyte était réellement stagnant.

L'étude électrochimique comprend :

- la mesure du potentiel d'abandon E_{ab} pendant 15 minutes, systématiquement effectuée avant chaque expérience

- l'étude voltamétrique du comportement de l'acier E24 dans les différents électrolytes
- l'électrodéposition de couches de rouille modèles par polarisation anodique et le suivi du phénomène par chronoampérométrie.

En ce qui concerne l'étude voltamétrique, les courbes sont obtenues à l'issue d'un balayage en potentiel croissant de -1200 mV à -400 mV/ECS avec une vitesse de variation du potentiel dE/dt de 1 mV/s. L'examen des courbes de polarisation permet d'obtenir un grand nombre de renseignements sur le comportement d'une électrode plongée dans un réactif donné, en particulier en ce qui concerne son aptitude à la passivation ou encore à la corrosion par piqûre. Toutes les courbes de polarisation présentées dans cette partie sont tracées en densité de courant i en fonction de E , et en $\log(i)$ en fonction de E .

La polarisation anodique consiste à porter le métal à un potentiel suffisamment grand par rapport au potentiel d'abandon E_{ab} pour que la dissolution de l'acier ($Fe \rightarrow Fe^{2+} + 2e^-$) se produise rapidement. Dans tous les cas, nous avons effectué une polarisation anodique à un potentiel E_{imp} voisin de $E_{imp} = E_{ab} + 150$ mV ou $E_{imp} = E_{ab} + 250$ mV. La chronoampérométrie consiste à mesurer l'évolution au cours du temps de la densité de courant i qui résulte de la dissolution de l'acier.

La durée des expériences électrochimiques varie de 15 minutes à 24 heures. Les couches obtenues après polarisation anodique sont rincées rapidement, séchées sous argon et protégées par une lamelle de verre avant analyses.

II.6. Micro-spectroscopie RAMAN

II.6.1. Principe

L'analyse par spectrométrie Raman consiste à exciter un matériau à l'aide d'une source lumineuse monochromatique (généralement un laser) afin de lui faire atteindre un niveau énergétique virtuel. Le matériau réémet ensuite une radiation qui est collectée puis analysée par un détecteur. Le photon incident possède une énergie $h\nu_0$ plus grande que celles associées aux transitions vibrationnelles (se situant dans le domaine infrarouge), mais cependant insuffisante pour provoquer une transition électronique vers les niveaux excités. La molécule se trouvant dans un état énergétique instable, va revenir à un état stable en réémettant un photon. Cette radiation comporte deux types de signaux décrits dans la figure 2.3.

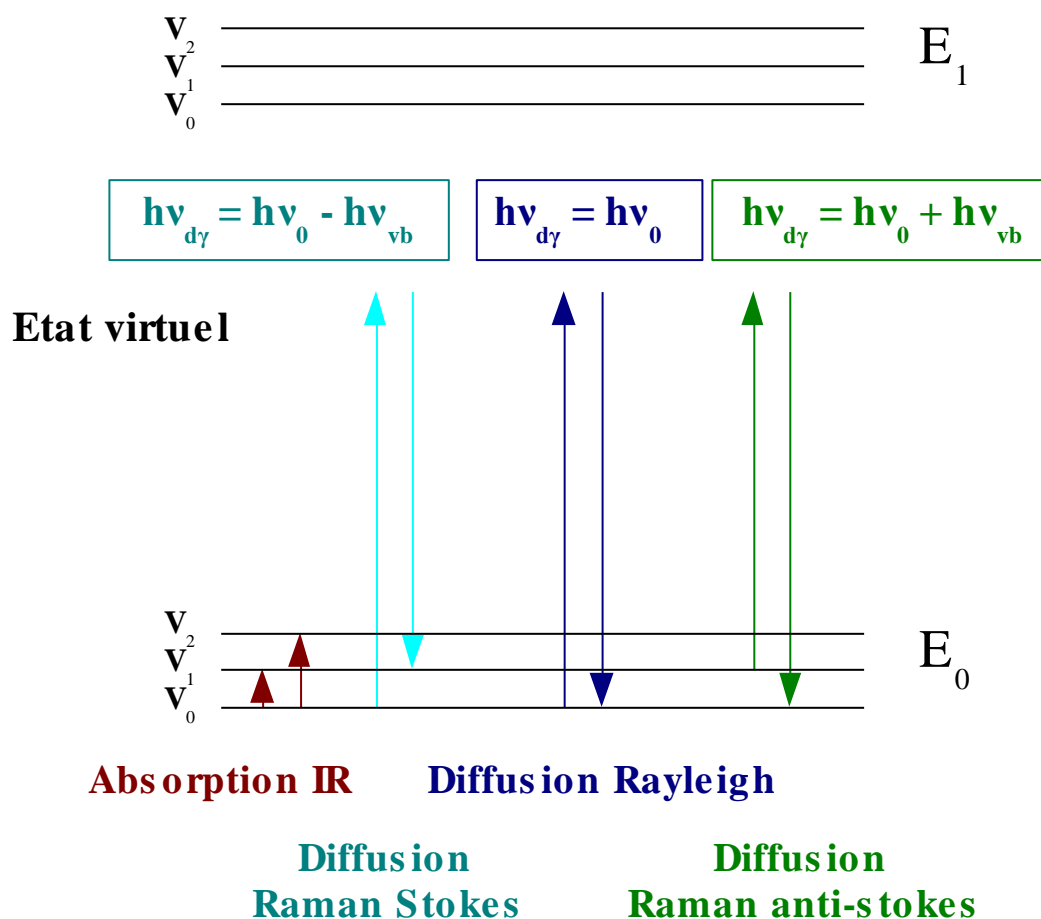


Figure 2.3 : Schéma théorique des changements d'états vibrationnels

Le premier phénomène, très majoritaire, correspond à la diffusion Rayleigh (R) : la radiation incidente est diffusée élastiquement (la molécule revient à son état d'origine) sans changement d'énergie donc de longueur d'onde. Le photon réémis possède exactement la même énergie $h\nu_0$ que le photon incident. Le second phénomène, très minoritaire, implique une interaction des photons avec la matière. La molécule peut alors absorber de l'énergie provenant des photons incidents : le photon réémis possède une énergie $h\nu_{dif}$ plus faible que $h\nu_0$, ce qui produit les radiations Stokes (S). La molécule peut aussi céder de l'énergie : le photon réémis possède une énergie $h\nu_{dif}$ plus importante que $h\nu_0$, ce qui provoque les radiations anti-Stokes (AS). La variation d'énergie observée correspond, en valeur absolue, à l'énergie de transition vibrationnelle : $h\nu_{vib} = |h\nu_{dif} - h\nu_0|$. Les spectres Raman présentent alors des pics d'intensité diffusée en fonction de l'énergie de transition vibrationnelle $h\nu_{vib}$ ou toute grandeur qui lui est proportionnelle, i.e. en cm^{-1} proportionnelle à la fréquence ν radiative.

II.6.2 Instrumentation et préparation des échantillons

Les spectres ont été enregistrés à l'aide du logiciel LabSpec sur un spectromètre Raman Horiba Jobin Yvon haute résolution couplé à un microscope confocal (Olympus BX 41, objectif x50) et utilisant un capteur CCD refroidi par effet Peltier. L'excitation est fournie par un laser He-Ne ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$). La zone d'analyse est d'environ $3 \times 3 \mu\text{m}$. Les spectres sont enregistrés à température ambiante à l'abri de la lumière. La puissance du laser est réglée entre 1,94 et 0,07 mW pour éviter un échauffement susceptible de provoquer une transformation du composé du fer étudié en hématite $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

Lorsqu'une couche de rouille issue d'un coupon immergé en milieu marin est analysée, il est réalisé dans la mesure du possible une coupe perpendiculaire à la surface du coupon. L'objectif est alors de réaliser une analyse en coupe afin de pouvoir observer l'éventuelle stratification de la couche de rouille. Les tronçons ainsi obtenus sont placés directement sur une lame de verre et recouverts d'une lamelle afin de prévenir l'oxydation des composés ferreux réactifs vis-à-vis de l'oxygène.

Dans le cas de précipités en solution, l'échantillon est préalablement centrifugé et le culot est ensuite déposé sur la lame de verre avant d'être recouvert d'une lamelle.

II.7 Analyse par diffraction des rayons X

II.7.1 Principe

Les radiations X possèdent la propriété de traverser les matériaux et d'être diffractés par les atomes. L'angle de diffraction dépend alors de l'énergie des photons du rayonnement incident et de la distribution atomique. Le spectre de diffraction obtenu constitue l'empreinte caractéristique de la structure et des substances cristallines analysées. L'état cristallin est caractérisé par la répartition tri périodique dans l'espace d'un motif atomique. Cette répartition ordonnée constitue des plans parallèles et équidistants que l'on nomme plans réticulaires $\{h,k,l\}$. Les distances interréticulaires sont de l'ordre de $0,15 \text{ \AA}$ - 15 \AA et dépendent de la disposition et du diamètre des atomes dans le réseau cristallin. Elles sont constantes, caractéristiques du cristal et peuvent être déterminées grâce à la diffraction de rayons X.

Un faisceau de rayons X monochromatique et parallèle qui frappe un cristal est diffracté dans une direction donnée par chacune des familles des plans réticulaires à chaque fois que la condition ou loi de Bragg est réalisée :

$$2d \cdot \sin\theta = n\lambda \quad (1)$$

Avec λ la longueur d'onde du faisceau de rayons X, d la distance entre deux plans réticulaires, θ l'angle d'incidence des rayons X et n un nombre entier naturel.

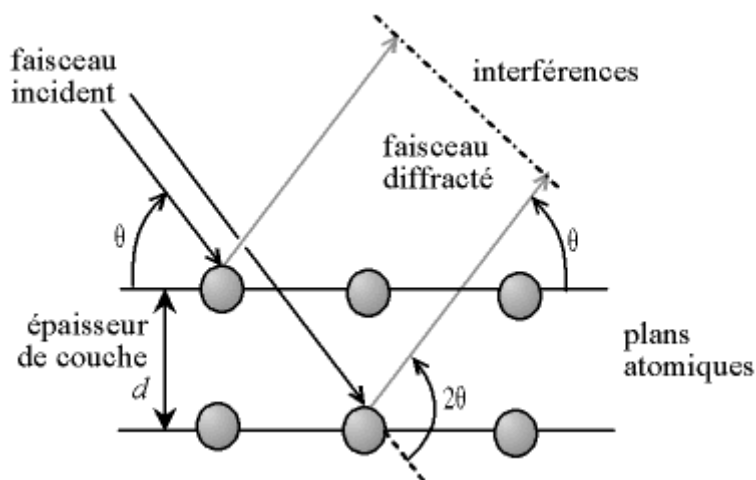


Figure 2.4 : Principe de diffraction en rayon X, selon la loi de Bragg

Pour que la diffraction se produise, il faut que les ondes diffractées par les différents plans soient en phase, c'est-à-dire que la différence de marche (cf. figure 2.4) des rayons rencontrant ces plans soit égale à un nombre entier n . Dans ce cas, l'angle suivant lequel le faisceau de rayons X est dévié est égal à l'angle d'incidence θ et est caractéristique de la distance inter réticulaire d . Si l'on connaît la longueur d'onde λ du faisceau de rayons X, on peut mesurer à partir des angles de diffraction θ les distances d et ainsi déterminer la nature du cristal.

Le matériau est donc bombardé par un faisceau de rayons X monochromatiques et parallèles de longueur d'onde connue, produit grâce à une anticathode de cuivre le plus souvent. L'échantillon tourne d'un mouvement uniforme autour d'un axe situé dans son plan (cercle goniométrique), permettant ainsi d'augmenter le nombre d'orientations possibles des plans réticulaires. Les particules étant orientées au hasard, il y aura toujours une famille de plans donnant lieu à la diffraction, de telle sorte que l'on obtiendra simultanément tous les faisceaux susceptibles de diffracter : ces faisceaux forment des cônes de demi-angle au sommet 2θ .

Un détecteur mesure l'intensité du rayonnement X diffracté dans certaines directions. Il tourne autour du même axe mais à une vitesse double de celle de l'échantillon. Pour un angle d'incidence θ , l'angle mesuré par le déplacement du compteur sera donc 2θ . Un

diaphragme à couteau permet d'éliminer l'effet parasite du faisceau incident dans les petits angles ($2\theta < 10^\circ$). La courbe obtenue donne la variation de l'intensité diffractée en fonction de l'angle 2θ .

II.7.2. Instrumentation et préparation des échantillons

Les diffractogrammes ont été réalisés à l'aide d'un diffractomètre Bruker-AXS D8 Advance, dont la radiation Cu K α possède une longueur d'onde $\lambda = 0,15406$ nm, et utilisé en géométrie de Bragg-Brentano θ - 2θ . L'acquisition des résultats se fait à l'aide du logiciel Diffract+. La diffraction des rayons X a servi exclusivement à l'analyse de précipités en suspension issus des expériences en laboratoire. Ces précipités sont d'abord filtrés à l'aide d'une pompe à vide sur un papier filtre et la pâte obtenue est ensuite déposée rapidement sur le porte échantillon et recouverte de glycérol afin de limiter l'oxydation durant l'analyse [9].

II.8. Microscopie électronique à balayage

II.8.1. Principe

La microscopie électronique à balayage est une technique basée sur le principe des interactions électrons-matière, capable de produire des images en haute résolution de la surface d'un échantillon. Elle permet l'observation de la morphologie de surface avec une résolution et une profondeur de champ beaucoup plus importantes qu'un microscope optique. Un microscope électronique à balayage est essentiellement composé d'un canon à électrons et d'une colonne électronique dont la fonction est de produire une sonde électronique fine sur l'échantillon, d'une platine porte-objet permettant de déplacer l'échantillon dans les 3 directions et de détecteurs permettant de détecter et d'analyser les rayonnements émis par l'échantillon (figure 2.5).

Un faisceau électronique fin est projeté sur l'échantillon à analyser. L'interaction entre le faisceau électronique et l'échantillon génère des électrons secondaires, de basse énergie, qui sont accélérés vers un détecteur d'électrons secondaires qui amplifie le signal. A chaque point d'impact correspond ainsi un signal électrique. L'intensité de ce signal électrique dépend à la fois de la nature de l'échantillon au point d'impact qui détermine le rendement en électrons secondaires et de la topographie de l'échantillon au point considéré. Il est ainsi possible, en balayant le faisceau sur l'échantillon, d'obtenir une cartographie de la zone balayée.

La sonde électronique fine est produite par un canon à électrons qui joue le rôle d'une source réduite par des lentilles électroniques qui jouent le même rôle vis-à-vis du faisceau d'électrons que des lentilles conventionnelles, photoniques, dans un microscope optique. Des bobines disposées selon les deux axes perpendiculaires à l'axe du faisceau et parcourues par des courants synchronisés permettent de soumettre la sonde à un balayage. Les lentilles électroniques, qui sont généralement des lentilles magnétiques et les bobines de balayage forment un ensemble que l'on appelle la colonne électronique.

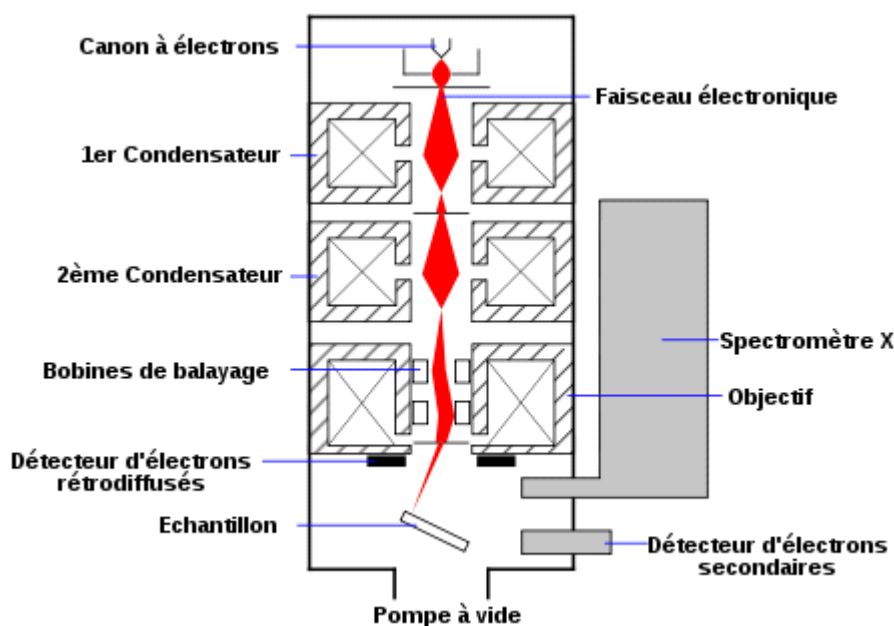


Figure 2.5 : Schéma d'un microscope électronique à balayage

II.8.2. Appareillage

Dans ce travail, l'appareil utilisé est un microscope électronique à balayage de marque PHILIPS FEI Quanta 200F, travaillant sous vide partiel et équipé d'un système « EDAX GENESIS » préalablement calibré par une analyse d'un échantillon de cobalt pur. La tension a été réglée (sauf cas particulier) à 20 kV. Il s'agit d'une sonde d'analyse par dispersion d'énergie X (EDS - X-Ray Energy Dispersive Spectrometry) qui permet la détermination de la nature des éléments présents.

II.9. Evaluation de la biomasse microbienne

II.9.1 Conditions de culture

Les bactéries sont cultivées à 30°C en aérobiose et/ou anaérobiose. Les conditions d'anaérobiose sont assurées par une enceinte MAC500 (Don Whitley Scientific limited) sous une atmosphère N₂/H₂ (90/10) ou N₂/H₂/CO₂ (80/10/10). Les souches bactériennes isolées et purifiées sont conservées à -20°C et -80°C en cryotubes dans leur milieu de culture avec 20 % (v/v) de glycérol. Afin de vérifier que les conditions d'anaérobiose sont bien respectées, un témoin coloré à base de résazurine (Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane 2g ; glucose anhydre 0,1g ; résazurine 0,2 % 250 µL ; H₂O qsp 10 mL) est placé à l'intérieur de l'enceinte et changé tous les mois.

II.9.2 Dénombrement des bactéries par croissance sur milieux gélosés

La concentration bactérienne d'un échantillon solide ou liquide peut être déterminée via un dénombrement de colonies sur milieu de culture gélosé. A partir d'un prélèvement de suspension bactérienne, des dilutions successives au 1/10 sont réalisées dans le même milieu. Des aliquotes de 100 µL sont ensuite étalés en surface de la gélose et les boîtes sont incubées à 30°C puis dénombrées tous les jours durant 7 jours. Le calcul de la concentration de la suspension repose sur le fait que chaque colonie se développant correspond à une bactérie initialement déposée sur la gélose. Le calcul se fait sur une moyenne de 3 essais. Les résultats sont exprimés en unités formant colonies (UFC) par quantité de matière, c'est-à-dire en UFC/mL ou UFC/g selon le type d'échantillon.

II.9.3 Dénombrement des bactéries par marquage au fluorochrome DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)

Le DAPI est un marqueur fluorescent qui se lie à l'ADN. L'échantillon (1 mL) est fixé en ajoutant 1mL de formaldéhyde 2 % et en effectuant une incubation de 15 minutes. Il est ensuite dilué dans du pyrophosphate di-sodium 12 mM (pour les échantillons mixtes) ou dans de l'eau ultra-pure (pour les cultures pures) jusqu'à une concentration adaptée au comptage. Lors des dilutions au pyrophosphate di-sodium, il est nécessaire de laisser les échantillons 20 minutes à 4°C afin que les cellules bactériennes désorbent des cristaux de produits de corrosion. La solution de DAPI est ensuite ajoutée à l'obscurité pour une concentration finale de 0,5 mg/L. Les échantillons sont laissés 15 minutes à l'obscurité puis filtrés sous vide (10-20 mmHg) sur un filtre 0,2 µm noir (Whatman Scheicher & Scull, Nuclepore Track-Etch

Membrane, 25 mm de diamètre) reposant sur un sous-filtre 1,2 µm (Millipore Nitrocellulose Membrane, 25 mm de diamètre). Le filtre noir est ensuite déposé sur une lame de verre entre deux gouttes d'huile à immersion non fluorescente (Leica type F) et recouvert d'une lamelle. L'observation est réalisée au microscope à épifluorescence (Leica DMRB, lampe à vapeur de mercure, grossissement x1000, filtre UV A Leica). Le dénombrement se fait sur au moins 10 champs et la formule suivante (équation 2) est utilisée afin de calculer la concentration cellulaire :

$$[c] = \frac{(mR)}{V} \times F \quad (2)$$

Avec :

$[c]$ = concentration cellulaire en bactéries/mL

m = moyenne de bactéries/champ observé

R = rapport du microscope (surface de la tourelle de filtration/surface du champ observé)

V = volume filtré

Fd = facteur de dilution

Les résultats obtenus sont les moyennes de trois dénombrements réalisés à partir de trois prélèvements indépendants et sont exprimés en bactéries/mL ou en bactéries/g d'échantillon.

II. 10 Enrichissement de la flore bactérienne cultivable

Les prélèvements réalisés sur les coupons puis traités par broyage mécanique sont ensemencés au 1/10 dans du marine broth pour les conditions aérobies et du marine broth ainsi que du milieu baar modifié pour réducteurs de sulfates pour les conditions anaérobies. Ces cultures sont ensuite incubées durant 7 jours à 30°C.

II. 11 Isolement de souches bactériennes cultivables

Les échantillons ayant permis le dénombrement sur milieux gélosés sont utilisés afin de discerner les différences morphologiques des colonies bactériennes (taille, forme, couleur, opacité). Chaque type de colonie bactérienne est prélevé à l'aide d'une oese et utilisée pour ensemencer 5 mL du même type de milieu de culture que celui préalablement utilisé pour son

dénombrement. Une fois la culture dense, elle est étalée sur milieu de culture gélosé afin de vérifier sa pureté.

II.12 Caractérisation biochimique des souches bactériennes isolées

II.12.1 Coloration de Gram

La coloration de Gram des cellules bactériennes permet de mettre en évidence la morphologie cellulaire ainsi que les propriétés de la paroi bactérienne. Ces propriétés sont utilisées pour distinguer et classer les différentes bactéries.

Un frottis est réalisé en déposant sur une lame de verre une goutte d'eau stérile et en y dissociant un fragment de colonie isolée. Le frottis est fixé à la chaleur par séchage à la flamme. La lame est ensuite plongée dans une solution de cristal violet (30 secondes) afin de colorer les cellules. Le frottis est ensuite recouvert de réactif lugol (mordant) pendant 30 secondes ce qui permet de fixer la coloration (mordançage). Une décoloration à l'éthanol est ensuite réalisée. Les bactéries à Gram négatif sont décolorées sous l'action de l'alcool tandis que les bactéries à Gram positif restent colorées en violet. La dernière étape sert à recolorer les bactéries à Gram négatif en rose avec de la fuchsine (30 secondes) afin de les visualiser tout en les distinguant des autres. La lame est ensuite observée au microscope optique sous huile à immersion avec un objectif 100 (grossissement x1000) (Leica, Leitz Biomed).

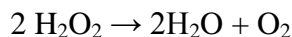
II.12.2 Oxydase

Ce test est à la base de l'identification des différents groupes de bactéries à Gram négatif. Il consiste à mettre en évidence la présence d'une enzyme de la chaîne respiratoire, la cytochrome *c* oxydase. (Notons en effet que le test n'indique pas seulement si la bactérie possède ou non des cytochromes oxydase mais plutôt un certain type de cytochrome oxydase lié à sa réactivité avec le substrat NDPD. Le cytochrome *c* est ainsi périplasmique et peut réagir. *E. coli* est oxydase et possède bien des cytochromes oxydase (elle respire O₂) mais membranaires et donc qui ne réagissent pas avec le substrat NDPD).

Un disque oxydase (Bio-Rad) contenant de l'oxalate de N-diméthyl parahénylène diamine est placé sur une lame propre et humidifié avec une goutte d'eau distillée. Un fragment de colonie à analyser est ensuite écrasé avec le bout d'une pipette pasteur boutonnée sur le disque. L'oxydation du substrat sera accompagnée d'une coloration violette et mettra en évidence les bactéries dites oxydase positive, c'est-à-dire possédant l'enzyme.

II.12.3 Catalase

La catalase est une enzyme permettant d'empêcher l'accumulation d'H₂O₂ dans la cellule. Cette enzyme catalyse la réaction suivante :



La technique consiste à déposer sur une lame propre une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes (H₂O₂) et d'y déposer un fragment de la colonie. Les souches dites catalase positive, c'est-à-dire possédant l'enzyme, sont repérées par un dégagement gazeux.

II.13. Extraction de l'ADN

Durant les travaux d'étude in situ de corrosion, l'extraction de l'ADN a été réalisée sur différents types d'échantillons : directement sur des échantillons de biofilm prélevé sur les coupons métalliques ou après mise en culture de ces mêmes échantillons (souche pure ou culture en mélange correspondant aux enrichissements).

II.13.1. Extraction de l'ADN génomique de souches pures

Le kit NucleoSpin Tissue (Marcherey-Nagel) (annexe) a été utilisé afin d'extraire l'ADN génomique des souches bactériennes isolées, à partir d'une de culture liquide de 5 mL d'une nuit.

II.13.2. Extraction de l'ADN génomique d'échantillons de biofilm

Pour extraire l'ADN génomique des bactéries présentes dans les échantillons prélevés sur les coupons métalliques et conservés à -20°C, deux kits» (MO BIO Laboratories, Inc.), qui permettent le traitement d'échantillons complexes issus de l'environnement sont utilisés : « ADN PowerSoil » (annexe) et « PowerMax Soil » (annexe). Ce dernier, plus onéreux, permet une meilleure extraction à partir d'échantillons en grands volumes et/ou contenant peu de micro-organismes.

II.13.3. Extraction de l'ADN génomique d'enrichissements

Concernant les enrichissements de la flore cultivable, l'extraction a été réalisée à l'aide du kit « PowerMax Soil » (annexe).

II.13.4. Contrôle de pureté et estimation de la concentration en ADN extrait

Une dilution de l'ADN extrait est réalisée au 1/40, puis l'absorbance de ces solutions est mesurée à 260 puis 280 nm au spectrophotomètre. La pureté de l'ADN est donnée par le rapport DO_{260nm} / DO_{280nm} , qui doit être compris entre 1,8 et 2. L'estimation de la concentration en ADN est donnée par la DO_{260nm} . Une unité de DO_{260nm} correspond à environ 50 ng/μL d'ADN. Par conséquent, la concentration en ADN est donnée par la relation suivante :

$$[ADN] \text{ en ng/}\mu\text{L} = DO_{260nm} \times 50 \text{ ng/}\mu\text{L} \times 40 \text{ (facteur de dilution)}$$

II.14. Séquençage de l'ADNr 16S des souches isolées

II.14.1. Choix des amorces

Un couple d'amorces a été défini pour amplifier le gène de l'ARNr 16S, afin de le séquencer et ainsi d'identifier les bactéries isolées. Ces amorces ont été choisies dans des régions conservées situées aux extrémités du gène, permettant ainsi d'amplifier la plus grande partie possible de ce gène chez le plus grand nombre possible d'espèces bactériennes. Afin de mettre en évidence les régions conservées entre différentes espèces, les séquences du gène de l'ARNr 16S de plusieurs groupes bactériens phylogénétiquement éloignés ont été alignées à l'aide du programme Multalin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) : *α-proteobacterium*, *β-proteobacterium*, *γ-proteobacterium* et *vibrio*. Ces amorces 16S « universelles » sont décrites ci-dessous :

Nom de l'amorce	Séquence
16S UnivF	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3'
16S UnivR	5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3'

II.14.2. Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)

La zone définie est amplifiée par PCR à l'aide du mélange réactionnel suivant : tampon « Taq + (NH₄)₂SO₄ » (1X) de Fermentas, 3 mmol/L MgCl₂, 0,32 mmol/L dNTP, 0,2 μmol/L de chacune des amorces, 2 unités d'ADN polymérase Taq (Fermentas) et environ 50 ng d'ADN, dans un volume final de 50 μL.

Le programme utilisé consiste en 3 étapes :

- Première dénaturation : 95°C pendant 2 minutes
- 30 cycles : 92°C pendant 30 secondes (dénaturation), 54°C pendant 30 secondes (hybridation des amorces), 72°C pendant 1 minute 30 (élongation)
- Elongation terminale : maintien à 72°C pendant 2 minutes.

Une électrophorèse de contrôle est réalisée sur gel d'agarose à 1% en utilisant de 1 à 10 µL d'ADN amplifié afin d'en vérifier la taille et estimer sa quantité. Le gel est préparé avec du tampon TBE (Tris 89 mmol/L, acide borique 89 mmol/L, EDTA 2 mmol/L et pH 8,3). A chaque échantillon est additionné du tampon de charge 6X (glycérol 50%, TBE 1X, bleu de bromophénol 0,3%). La migration des différents échantillons ainsi que 500 ng de marqueur de taille λDNA *HindIII/EcoR1* (Fermentas) s'effectue dans du tampon TBE à un voltage constant de 100 V. Après immersion dans un bain de bromure d'éthidium (BET) à 5µg/mL, les ADN sont visualisés par fluorescence sur une table UV. La concentration de l'ADN amplifié est estimée en comparant son intensité avec celle des bandes du marqueur de taille λDNA *HindIII/EcoR1*, dont la quantité est connue.

II.14.3. Séquençage

Le produit amplifié non purifié est envoyé à la société Eurofins MWG Operon (Allemagne) avec les amorces 16S UnivF et 16S UnivR afin que chaque ADN soit séquençé dans les deux sens. Les séquences ont été renvoyées sous formes de fichiers texte et sous forme de chromatogrammes afin que nous puissions vérifier et corriger les séquences reçues. Ensuite, les séquences obtenues avec l'amorce 16S UnivR ont été inversées à l'aide du logiciel « reverse complement » (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>), afin que toutes les séquences correspondent au même brin d'ADN. Les 2 séquences d'un même ADN sont ensuite alignées à l'aide du logiciel MACAW puis assemblées en une seule. Celle-ci est alors comparée aux banques de données à l'aide du logiciel Blast disponible sur le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ceci permet d'obtenir les séquences les plus ressemblantes et le nom des bactéries auxquelles elles se réfèrent. Les séquences de nos souches et celles qui leur correspondent le mieux dans les banques de données sont par la suite alignées à l'aide du programme Multalin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>). Enfin, le logiciel PHYLIP-3.69 permet de réaliser les arbres phylogénétiques à partir des séquences alignées. La souche *thermotoga* a été choisie

comme racine de l'arbre car elle est très différente phylogénétiquement des souches échantillonnées sur les coupons.

II.15. Analyse par Temperature Time Gel Electrophoresis (TTGE)

II.15.1. Principe

La TTGE est une électrophorèse sur gel de polyacrylamide utilisant un gradient de température comme condition dénaturante. Cette méthode permet de séparer des fragments d'ADN de taille identique en fonction de leur composition en bases [10]. En effet, les liaisons A-T étant moins stables que les liaisons G-C, sous l'effet de la température, les liaisons se rompent d'abord entre les bases A-T puis entre les bases G-C. Au cours de la migration, les conditions dénaturantes vont augmenter (augmentation de la température) de manière homogène. L'ADN double brin migre facilement tandis qu'une fois partiellement dénaturé il est stoppé. Le taux de dénaturation de l'ADN et donc sa position sur le gel dépendra de sa composition en bases. Afin que l'ADN reste partiellement double brin, une queue GC est ajoutée à l'une des amorces ayant servi à la PCR. Il se forme ainsi une pince qui ne peut plus migrer.

Cette technique est très sensible et permet dans certaines conditions, de séparer deux ADN ayant seulement une différence d'un nucléotide [11].

II.15.2. Choix des amorces

Des amorces ont été choisies dans des régions conservées du gène de l'ARNr 16S encadrant une région variable de ce gène. Afin de mettre en évidence les régions conservées et les régions variables entre espèces différentes, le même alignement de séquences que celui effectué pour le séquençage du gène de l'ARNr 16S des souches isolées a été utilisé. Une « queue GC » a été ajoutée à l'une des 2 amorces. Les nouvelles amorces sont décrites ci-dessous.

Nom de l'amorce	Séquence
774F	5'-GGAGCAAACAGGATTAGATA-3'
1392Rgc	5'- <u>CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGGCACGGGGGG</u> GTGACGGGCGGTGTGTA-3'

(La queue GC est soulignée)

II.15.3. Amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction)

La PCR est réalisée avec le mélange réactionnel suivant : tampon « Taq + (NH₄)₂SO₄ » (1X) (Fermentas), 3 mmol/L MgCl₂, 0,32 mmol/L dNTP, 0,2 µmol/L de chacune des amorces, 2 unités d'ADN polymérase Taq (Fermentas) et environ 50 ng d'ADN.

Le programme utilisé consiste en 3 étapes :

- Première dénaturation : 94°C pendant 2 minutes 30
- 35 cycles : 92°C pendant 30 secondes (dénaturation), 56°C pendant 30 secondes (hybridation des amorces), 72°C pendant 30 secondes (élongation)
- Elongation terminale : maintien à 72°C pendant 2 minutes.

Une électrophorèse de contrôle est réalisée sur gel d'agarose 2% en utilisant de 1 à 10 µL d'ADN amplifié afin d'en vérifier la pureté. Le gel est préparé avec du tampon TBE (Tris 89 mmol/L, acide borique 90 mmol/L, EDTA 2 mmol/L et pH 8,3). A chaque échantillon est additionné du tampon de charge 6X (glycérol 50%, TBE 1X, bleu de bromophénol 0,3%). La migration des différents échantillons s'effectue dans du tampon TBE à un voltage constant de 100 V. Après immersion dans un bain de bromure d'éthidium (BET) à 5µg/mL, les ADN sont visualisés par fluorescence sur une table UV.

Les produits de la PCR sont ensuite purifiés en utilisant le kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel) pour éliminer les dNTP libres (annexe) et ainsi être capable de mesurer au NanoDrop la concentration en ADN amplifié.

II.15.4. Conditions expérimentales de la TTGE

Le gel utilisé a été préparé en mélangeant 30 mL de solution de polyacrylamide 8 % (acrylamide-bisacrylamide (37,5 : 1) 8%, urée 7 M dans du tampon TAE 1,25X), avec 188 µL de persulfate d'ammonium 10 % p/v et 19 µL de tétraméthyl-éthylènediamine (TEMED).

La concentration d'ADN a été estimée par analyse en spectrophotométrie d'un microlitre d'échantillon purifié (Nanodrop™ 2000), et 500 ng ont été déposés dans chacun des puits du gel. La migration a été effectuée à une tension de 80 V avec un gradient de température allant de 65,8 à 69,7°C à la vitesse de 0,2°C/h.

Le gel est ensuite révélé à l'aide du colorant GelStar (Lonza) et visualisé à l'aide d'une lampe UV.

II.15.5. Analyse des gels de TTGE par densitométrie

Le pourcentage que représente chaque bande par rapport au total des bandes de l'échantillon est déterminé à l'aide du logiciel Diversity Database™ (Bio-Rad).

II.15.6. Séquençage

Chaque bande visible sur le gel de TTGE est découpée et placée dans 30 µl d'eau ultra pure. L'ADN diffuse dans l'eau et est ensuite amplifié par PCR selon le protocole décrit en II.12.3 (mais avec 35 cycles). La taille des ADN amplifiés et leur quantité est estimée sur gel d'agarose.

- Lorsque plus de 500 ng d'ADN amplifié sont obtenus à partir d'une bande, l'ADN est envoyé à la société Eurofins MWG Operon (Allemagne) avec les amorces 774F et 1392Rgc afin d'être séquencé dans les deux sens.
- Certains ADN, en très petite quantité après PCR, nécessitent d'être clonés pour pouvoir être ensuite séquencés. Ainsi, 8 µL de PCR sont mélangés dans un volume final de 20 µL à 50 ng de vecteur pGEM-T Easy (Promega), du tampon de ligase T4 (1X) (Promega) et 3 unités de ligase T4 (Promega). Après incubation d'une nuit à 16°C, 3 µL de mélange réactionnel sont mélangés à 100 µL de bactéries *E. coli* TG1 compétentes et placés à 0°C 30 min. Les bactéries sont soumises ensuite à un choc thermique à 42°C pendant 1 min 30 puis replacées à 0°C. Après ajout de 600 µL de milieu LB, les bactéries sont incubées à 37°C pendant 30 min, puis 200 µL sont étalés sur milieu LB gélosé sélectif contenant de l'ampicilline (100 µg/mL), du X-Gal (40 µg/mL) et de l'IPTG (40 µg/mL). Seules les bactéries ayant reçu un plasmide (recombinant ou non) peuvent se développer sur ce milieu. Les bactéries ayant reçu le vecteur seul sont bleues, alors que les bactéries qui ont reçu un plasmide recombinant (vecteur + insert) sont blanches. Après repiquage, des colonies blanches sont testées par PCR pour sélectionner celles qui ont un insert de la taille attendue. L'ADN plasmidique de ces souches est alors extrait avec le kit NucleoSpin Plasmid (Marcherey-Nagel) (annexe), quantifié au NanoDrop et envoyé à la société Genoscreen (Lilles) afin que l'insert soit séquencé dans les deux sens.

Références :

- [1] J.B. Memet, thèse de doctorat, Université de La Rochelle, 2000.
- [2] R.L. Starkey, *A study of spore formation and other morphological characteristics of Desulfovibrio desulfuricans*, Tarch Mikrobiol. **8** (1938) p. 268–304.
- [3] C.M. So, L.Y. Young, *Isolation and Characterization of a Sulfate-Reducing Bacterium That Anaerobically Degrades Alkanes*, Appl. Environ. Microbiol. **65** (1999) p. 2969-2976.
- [4] A.A. Olowe, J.M.R. Génin, *The mechanism of oxidation of Fe(II) hydroxide in sulphated aqueous media : importance of the initial ratio of the reactants*, Corros. Sci. **32** (1991) p. 965-984.
- [5] J.M.R. Génin, A.A. Olowe, P. Refait, L. Simon, *On the stoichiometry and Pourbaix diagram of Fe(II)-Fe(III) hydroxy-sulphate or sulphate containing green rust 2 ; an electrochemical and Mössbauer spectroscopy study*, Corros. Sci. **38** (1996) p. 1751-1762.
- [6] Ph. Refait, J.B. Memet, C. Bon, R. Sabot, J.-M.R. Génin, *Formation of the Fe(II)-Fe(III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel*, Corros. Sci. **45** (2003) p. 833-845.
- [7] Ph. Refait, S.H. Drissi, J. Pytkiewicz, J.-M.R. Génin, *The anionic species competition in iron aqueous corrosion: role of various green rust compounds*, Corros. Sci. **39** (1997) p. 1699-1710.
- [8] J.P. Riley, G. Skirrow, Ed. *Chemical Oceanography*, Vol. 2, 2nd ed., Academic Press, 1975.
- [9] H. C. B. Hansen, *Composition, stabilization, and light absorption of Fe(II-III) hydroxycarbonate (green rust)*, Clay Miner. **24** (1989) p. 663-669.
- [10] S. Green Tringe, E. M. Rubin, *Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples*, Nature Reviews Genetics **6** (2005) p. 805-814.
- [11] V.C. Sheffield, D.R. Cox, L.S. Lerman, R.M. Myers, *Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GCclamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes*, Proc Natl Acad Sci USA **86** (1989) p. 232-236.

Chapitre 3 : Interactions entre $RV(SO_4^{2-})$ et la souche bactérienne *Desulvibrio desulfuricans* subsp. *aestuarii*

Ce chapitre présente les résultats obtenus en étudiant l'évolution au cours du temps de suspensions aqueuses mettant en présence l'hydroxysulfate Fe(II,III) de type rouille verte, $RV(SO_4^{2-})$, et les bactéries sulfato-réductrices, *Desulvibrio desulfuricans* subsp. *aestuarii*. Pour l'essentiel, ces résultats sont ceux également décrits dans la publication [1]. La plupart des figures de ce chapitre sont extraites de cet article et sont donc annotées en langue anglaise.

Deux séries d'expériences ont été réalisées, l'une dans une atmosphère ne contenant pas de CO_2 (N_2 90%, H_2 10%), la seconde en atmosphère contenant du CO_2 (N_2 80%, H_2 10%, CO_2 10%). Rappelons que la présence de CO_2 dans l'atmosphère semble favoriser le développement des micro-organismes. D'autre part, dans la première série, les ions sulfates ont pour principale origine la rouille verte elle-même tandis que dans la seconde série une quantité importante de sulfates d'origine différente ($MgSO_4$ et $CaSO_4$) a été ajoutée au milieu. Les prélèvements et analyses réalisés ont permis d'obtenir des données concernant d'une part l'évolution de la flore bactérienne et d'autre part l'évolution de la phase solide. L'ensemble des conditions expérimentales est rappelé dans les tableaux 3.1.a et 3.1.b.

Première série (A)			
Composition du milieu de culture Starkey modifié (pour 1L de solution)		Autres paramètres expérimentaux	
NaCl	30 g	Atmosphère	N_2 (90%) / H_2 (10%)
Lactate de sodium (50%, en solution)	5,4 g	Température	30°C
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0 ou 2,28 mg	Quantité de $RV(SO_4^{2-})$	0,045 mol.L ⁻¹
$FeCl_2 \cdot 4H_2O$	1,04 mg ou 0		
NH_4Cl	1 g	pH de la suspension en début d'expérience	7,5
K_2HPO_4	0,5 g		
Acide ascorbique	0,1 g	Suivi de la biomasse	Microscopie à épifluorescence
Solution de vitamines	1 mL		
Solutions d'oligo- éléments	1 mL		

Tableau 3.1.a : Description de la première série d'expériences réalisées avec des suspensions contenant $RV(SO_4^{2-})$ et *Desulfovibrio desulfuricans*

Deuxième série (B)			
Composition du milieu de culture Postgate B (pour 1L de solution)		Autres paramètres expérimentaux	
NaCl	25 g	Atmosphère	N ₂ (80%) / H ₂ (10%) / CO ₂ (10%)
Lactate de sodium (50%, en solution)	3,5 g	Température	30°C
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 g	Quantité de RV(SO ₄ ²⁻)	0,02 mol.L ⁻¹
CaSO ₄	1 g	PH de la suspension en début d'expérience	7,5
NH ₄ Cl	1 g	Suivi de la biomasse	Croissance des cellules en milieu gélosé
Extrait de levure	1 g		

Tableau 3.1.b : Description de la deuxième série d'expériences réalisées avec des suspensions contenant RV(SO₄²⁻) et *Desulfovibrio desulfuricans*

I. Évolution de la rouille verte sulfatée dans les milieux de culture abiotiques

Le risque que les milieux utilisés pour permettre le développement bactérien puissent provoquer d'éventuelles modifications de la rouille verte a été évalué en premier lieu. Des témoins ont été préparés pour chaque milieu utilisé, en l'absence de BSR. Ces suspensions ont été analysées par diffraction aux rayons X après 2 mois de vieillissement en conditions anoxiques à 25°C. Rappelons qu'au cours de leur préparation, les suspensions ont également séjourné 1 heure à 80°C en atmosphère d'argon, procédure ayant pour objectif de décontaminer le système. Notons que des températures plus élevées (~120°C) sont considérées comme réellement stérilisantes. Nous avons donc préalablement réalisé une série d'expériences qui ont montré que la rouille verte tend à se transformer spontanément, dans les conditions expérimentales considérées ici, pour des températures supérieures ou égales à 90°C.

L'analyse du précipité extrait de la suspension de rouille verte sulfatée en milieu Starkey modifié sans sulfates (tableau 3.1.a) a permis d'obtenir le diffractogramme présenté ci-après (figure 3.1). Il a été mis en comparaison d'un diffractogramme obtenu avec une suspension standard de rouille verte sulfatée, vieillie dans sa solution mère en conditions anoxiques à 25°C, afin de mieux distinguer les variations. L'atmosphère de l'enceinte d'anaérobiose était exempte de CO₂.

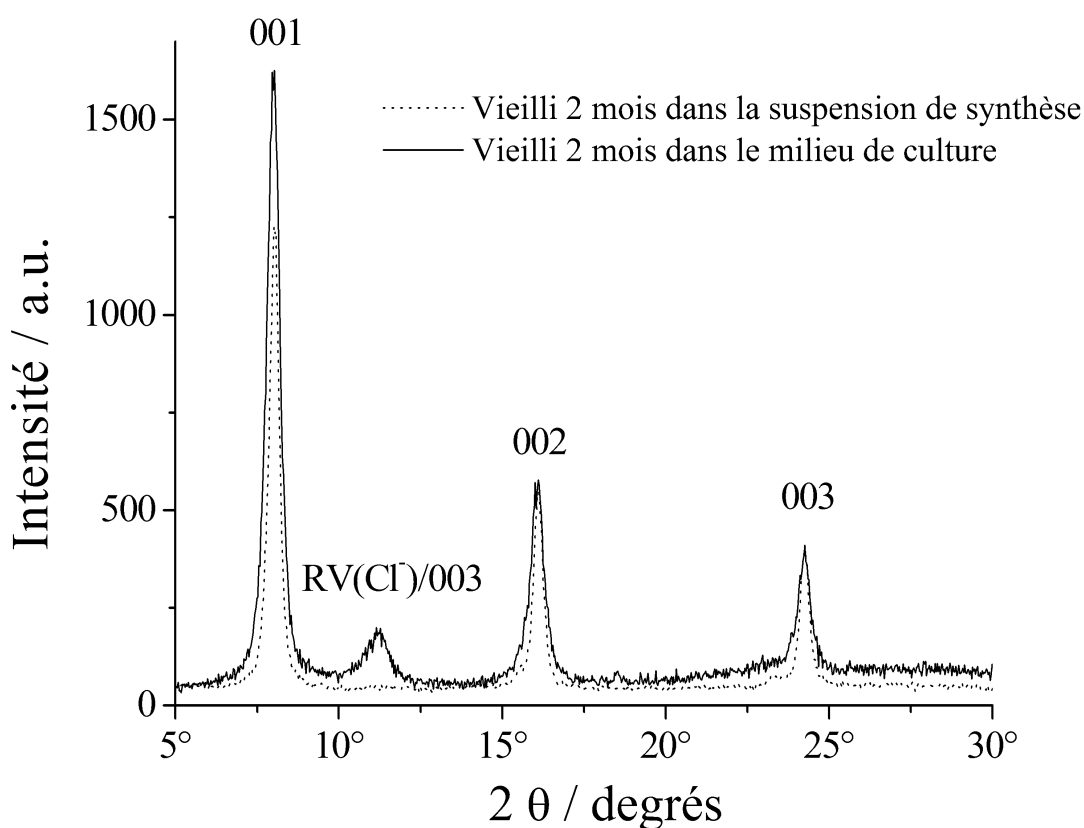


Figure 3.1 : Diffractogrammes de rayons X de suspensions de RV(SO₄²⁻) vieilles 2 mois sous enceinte d'anaérobiose en présence ou non du milieu de culture. Les pics de diffraction de RV(SO₄²⁻) sont désignés par les indices de Miller correspondants.

Deux légères différences ont pu être observées. Tout d'abord, on remarque la présence du pic de diffraction principal de la rouille verte chlorurée, à $2\theta_{003} = 11,17^\circ$ ($d_{003} = 0,791$ nm), en plus des trois pics principaux de la rouille verte sulfatée, respectivement à $2\theta_{001} = 8,02^\circ$, $2\theta_{002} = 16,08^\circ$ et $2\theta_{003} = 24,25^\circ$. La présence du pic attribué à la rouille verte chlorurée est la conséquence de l'addition du milieu de culture à la suspension de rouille verte sulfatée. En effet, l'ajout du milieu Starkey modifié sans sulfate induit une diminution de la concentration

en sulfate en solution et donc une légère dissolution de la rouille verte afin d'atteindre un état d'équilibre. Par la suite, le milieu de culture étant fortement concentré en chlorure, de la rouille verte chlorurée peut alors précipiter à partir des espèces dissoutes du fer.

Dans un deuxième temps on peut remarquer que les pics du diffractogramme de la rouille verte sulfatée vieillie dans un milieu de culture sont légèrement plus larges que ceux de la rouille verte vieillie dans sa solution mère. Cela indique que les cristaux sont légèrement plus petits ce qui peut aussi être la conséquence de leur dissolution partielle.

On peut en conclure que l'ajout du milieu Starkey modifié sans sulfates induit des modifications mineures de la rouille verte sulfatée qui n'interféreront pas dans le système rouille verte sulfatée/bactéries.

Les analyses réalisées avec le second milieu de culture, Postgate B (tableau 3.1.b) conduisent au même résultat.

II. Bioréduction de la rouille verte sulfatée en l'absence de CO₂ et d'autre sources de sulfates que RV(SO₄²⁻)

II.1 Conditions initiales

Cette partie expérimentale a pour but d'observer l'évolution de la flore bactérienne ainsi que celle des solides présents en limitant toute source de carbonates pouvant interférer avec le système.

Pour cela, l'atmosphère utilisée dans l'enceinte a été un mélange gazeux N₂ (90 %) / H₂ (10 %), permettant d'éviter la formation de rouille verte carbonatée en supprimant la source de CO₂ gazeuse. De plus, le milieu utilisé a été du milieu Starkey (voir chapitre 2) – favorable à la croissance des bactéries sulfato-réductrices – modifié pour les besoins de l'étude en remplaçant l'extrait de levure par une solution de vitamines (voir chapitre 2) et en ajoutant une solution de FeSO₄ · 7H₂O (2,28 mg.L⁻¹) ou de FeCl₂ · 4H₂O (1,04 mg.L⁻¹) selon les cas. Les autres sources de sulfates ont été supprimées afin de ne laisser disponibles pour la souche que les sulfates contenus dans la rouille verte et accessoirement dans certains cas la solution de FeSO₄ · 7H₂O.

Les concentrations en Fe²⁺ et SO₄²⁻ dissous à la fin de la formation de RV(SO₄²⁻) dans les mêmes conditions expérimentales que celles considérées ici ont été déterminées précédemment [2]. Elles valent : [Fe²⁺] ~ 25 × 10⁻⁴ mol.L⁻¹ et [SO₄²⁻] ~ 5 × 10⁻⁴ mol.L⁻¹. Ces

valeurs sont probablement celles de l'équilibre entre la rouille verte et la solution. On notera que la quantité de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ajoutée, $2,28 \text{ mg.L}^{-1}$ soit $8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, est négligeable par rapport à ces valeurs. La comparaison entre les deux cas expérimentaux, c'est-à-dire avec $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ou avec $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, devrait permettre de le vérifier.

Concernant la concentration bactérienne initiale, là encore deux cas de figure ont été envisagés. Dans un premier temps les tests ont été menés avec une concentration initiale proche de 10^7 bactéries. mL^{-1} , permettant ainsi de mettre en évidence une potentielle augmentation de la biomasse. Le second cas envisagé a été une concentration maximale, proche de 10^9 bactéries. mL^{-1} , utilisée dans la seule étude précédemment consacrée aux interactions $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-}) / \text{BSR}$ [3].

Enfin la concentration initiale en rouille verte sulfatée utilisée a été de $0,045 \text{ mol.L}^{-1}$, assez élevée afin d'avoir une forte disponibilité pour les concentrations élevées en bactéries.

II.2 Suivi de la concentration bactérienne au cours du temps

Le suivi de la concentration bactérienne a été fait dans cette partie à l'aide du marquage au fluorochrome DAPI et observation au microscope à épifluorescence (figure 3.2).

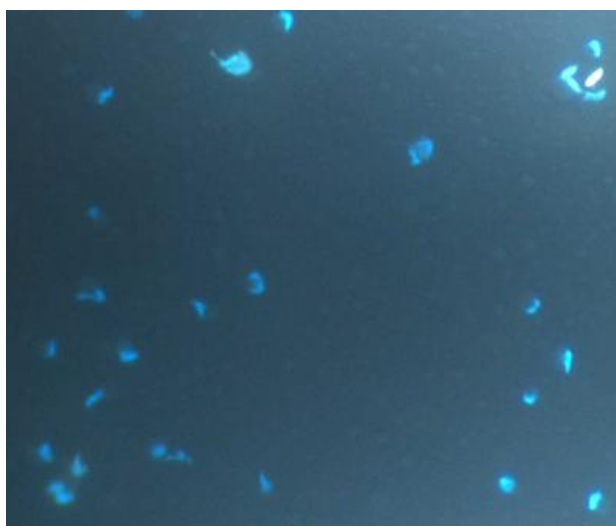


Figure 3.2 : Observation par microscopie à épifluorescence du marquage par fluorochrome DAPI de la souche *Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *aestuarii*

On peut voir sur la figure 3.3 l'évolution de cette flore en fonction du temps et des conditions initiales.

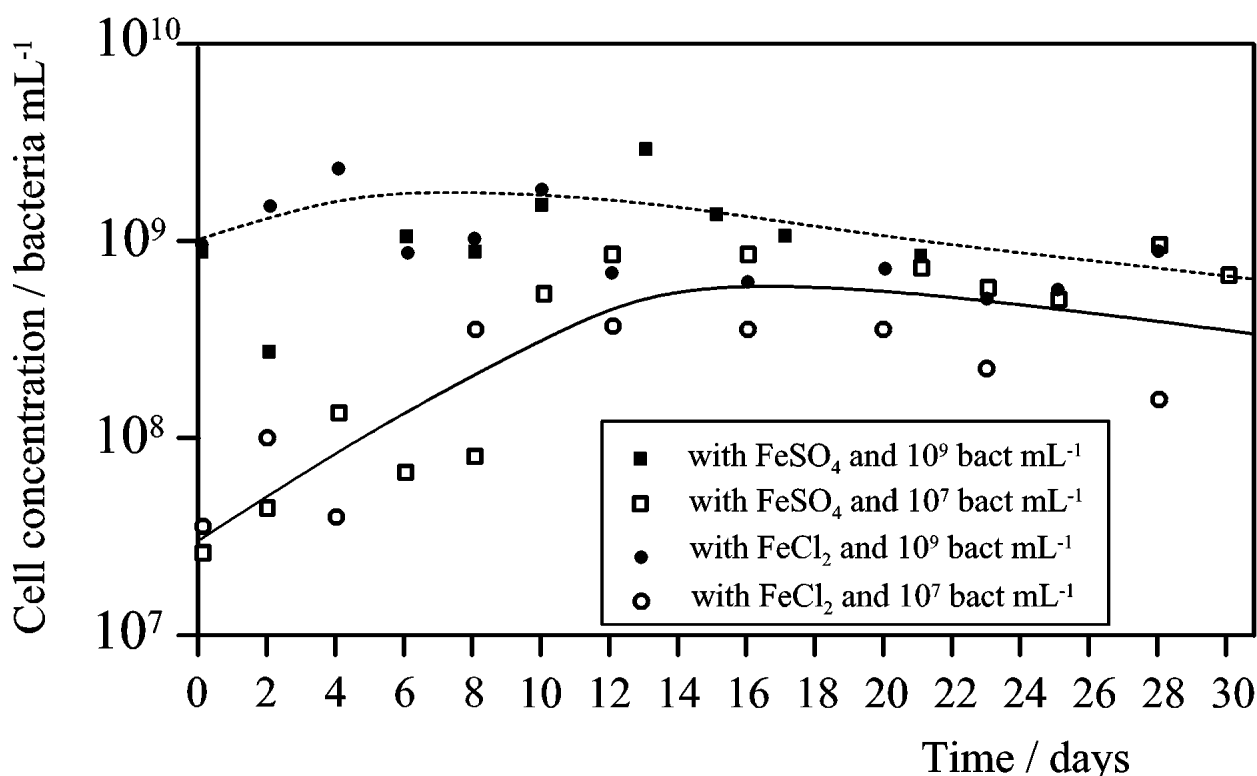


Figure 3.3 : Suivi de la concentration de *Desulfovibrio desulfuricans* en fonction du temps en présence de $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$, selon l'addition de sulfates en solution ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,28 mg/L) ou non (FeCl_2 1,04 mg/L) et selon la concentration initiale en bactéries (10^7 ou 10^9 bactéries.mL⁻¹).

Dans chacune des conditions étudiées, on peut constater que la concentration cellulaire commence par augmenter puis se stabilise ou décroît légèrement. Dans le cas des inoculums proche de 10^7 bactéries.mL⁻¹, on peut voir une augmentation atteignant des valeurs proches de 10^9 bactéries.mL⁻¹ après 12 à 14 jours. Concernant les concentrations initiales proches de 10^9 bactéries.mL⁻¹, les valeurs restent proches de celles de départ et lorsqu'il y a augmentation celle-ci est moins apparente.

L'autre information fournie par ce graphique est le fait que la croissance est indépendante de l'addition de sulfates dans le milieu. En effet, quelle que soit la solution ajoutée, les tendances des courbes sont les mêmes et les variations sont trop faibles pour indiquer une différence issue des conditions initiales. Ceci est cohérent avec le fait que la concentration initiale en sulfates dissous en équilibre avec la rouille verte, estimée à 5×10^{-4} mol.L⁻¹, est très supérieure à la concentration supplémentaire due à l'ajout de sulfate de fer, soit 8×10^{-6} mol.L⁻¹.

II.3 Résultats physico-chimiques

II.3.1 Micro-spectroscopie Raman

L'évolution au cours du temps de la phase solide présente en suspension a été étudiée en parallèle par micro-spectroscopie Raman. Les résultats obtenus sont tous identiques et ne dépendent ni de la concentration initiale en BSR, ni de la présence de FeSO_4 dissous supplémentaire. A titre d'exemple, une série de spectres obtenus avec FeSO_4 et la concentration maximale en BSR est présentée sur la figure 3.4.

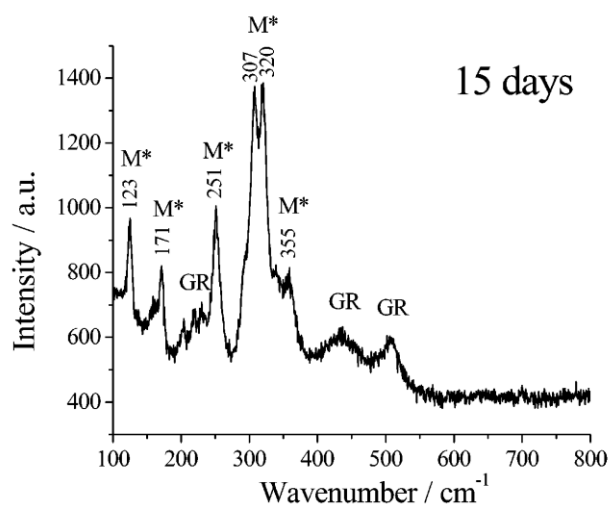
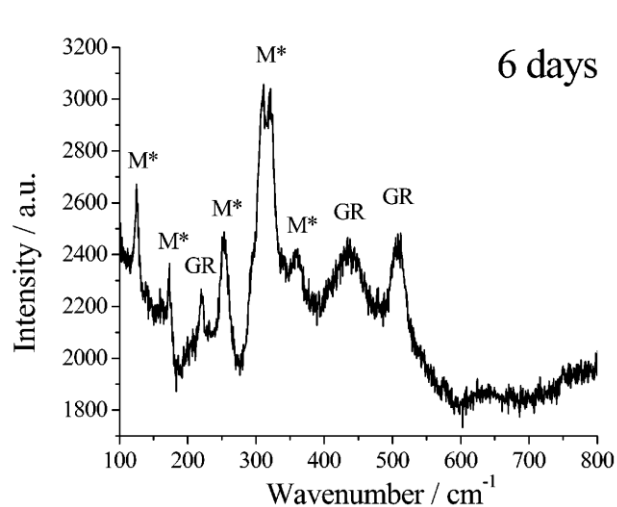
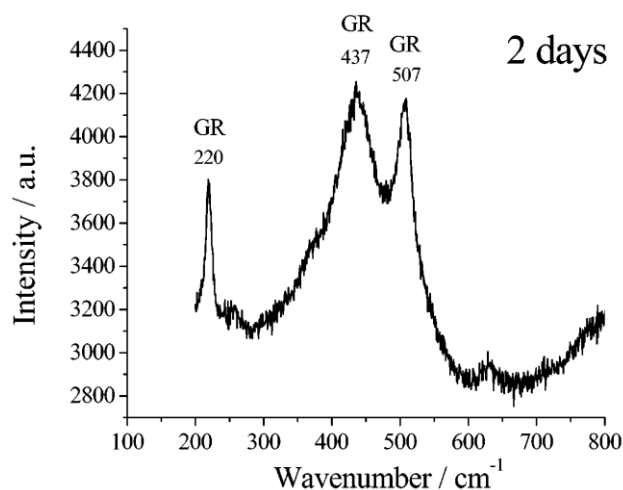


Figure 3.4 : Spectres Raman montrant l'évolution du précipité en fonction du temps durant l'incubation du mélange rouille verte sulfatée / *Desulfovibrio desulfuricans*. Concentration initiale en cellules : 10^9 bactéries. mL^{-1} , FeSO_4 ajouté. Les pics Raman notés M* représentent la Mackinawite oxydée et GR ceux de la rouille verte sulfatée.

Le spectre obtenu 2 jours après la mise en présence des BSR et la RV est caractéristique de la rouille verte sulfatée avec les trois pics principaux à 220, 437 et 507 cm^{-1} [4]. Les sulfures de fer ne sont pas détectés ce qui indique que la quantité d'espèces sulfures produites par l'activité métabolique des bactéries sulfato-réductrices est encore négligeable. Après 6 jours, le spectre de la rouille verte est toujours prédominant. En revanche, un autre composé est observé dont les pics sont à 23, 171, 251, 307, 320 et 355 cm^{-1} . Ce spectre a récemment été mis en évidence et attribué à de la mackinawite partiellement oxydée [5]. Ce terme désigne un composé conservant la même structure que la mackinawite $\text{Fe}^{\text{II}}\text{S}$ mais ayant subi une oxydation partielle de ses ions $\text{Fe}(\text{II})$ en $\text{Fe}(\text{III})$. Selon une étude antérieure réalisée par spectrométrie Mössbauer [6], la structure de la mackinawite peut supporter jusqu'à 20 % de $\text{Fe}(\text{III})$. La formule chimique proposée est $\text{Fe}^{\text{II}}_{1-3x}\text{Fe}^{\text{III}}_{2x}\text{S}$, les valeurs que peut prendre le paramètre x restant à déterminer.

Enfin après 15 jours, les analyses effectuées montrent toujours les mêmes spectres avec des pics de mackinawite partiellement oxydée plus intense et ceux de la rouille verte toujours présents.

II.3.2 Diffraction des rayons X

L'analyse par diffraction des rayons X a été faite à la fin de l'étude (30 jours) et est présentée dans la figure 3.5.

Les diffractogrammes obtenus peuvent ne pas apparaître cohérents avec les résultats précédents (évolution de la biomasse et spectres Raman). Tout d'abord, le composé majoritairement détecté est la rouille verte. Dans le cas où FeSO_4 a été ajouté, aucun autre pic n'est observé. Notons que cette situation est celle qui prévaut généralement [7], la mackinawite pouvant subsister longtemps sous forme nanocristalline dans certaines conditions [5]. Lorsqu'elle est ainsi mal cristallisée, la mackinawite est très difficilement observable par diffraction X, comme l'illustre la figure 3.5.a. Elle peut donc passer inaperçue et le recours à la spectrométrie Raman est indispensable. A l'inverse, la spectrométrie Raman semble dans certains cas surestimer la proportion de mackinawite.

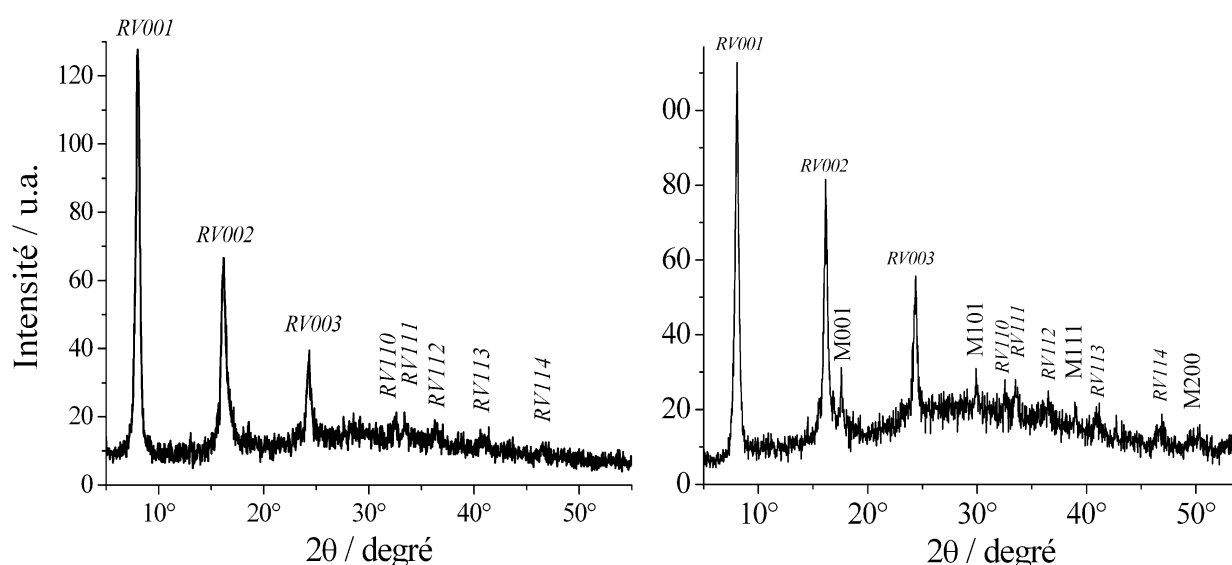


Figure 3.5 : Diffractogrammes de rayons X des composés du fer présents après 30 jours de vieillissement d'une suspension de rouille verte sulfatée et de bactéries *Desulfovibrio desulfuricans*. Concentration initiale de 10^9 bactéries.mL⁻¹ avec ajout de FeSO₄ (a) ou FeCl₂ (b). RVhkl et Mhkl désignant respectivement les pics de diffraction de RV(SO₄²⁻) et de mackinawite avec les indices de Miller correspondant.

Malgré tout, en présence de FeCl₂ dissous, les principaux pics de la mackinawite sont visibles, à environ 17,7°, 29,9°, 39° et 49,5°. Deux hypothèses pouvant être avancées : (i) la quantité de mackinawite formée est supérieure dans ce cas ou (ii) la cristallisation de la mackinawite a été plus rapide. Quoiqu'il en soit, ce diffractogramme confirme la transformation partielle de la rouille verte sulfatée en mackinawite, résultat jamais encore observé, puisque la seule étude antérieure [3] mentionnait la biotransformation de la rouille verte en greigite Fe₃S₄. Il confirme par ailleurs que la mackinawite partiellement oxydée, formellement identifiée par spectroscopie Raman comme le seul sulfure de fer présent, se caractérise par diffractogramme X très similaire à celui de la mackinawite Fe^{II}S.

III. Bioréduction de la rouille verte sulfatée en atmosphère contenant du CO₂ et en présence de sulfates

III.1 Conditions initiales

La première série d'expériences avait été conçue avec le souci de minimiser toute possibilité d'évolution de RV(SO₄²⁻) sous l'influence de facteurs autres que l'activité bactérienne elle-même. Rappelons que la première et unique étude focalisée sur les interactions RV(SO₄²⁻) / BSR avait mis en évidence une transformation de RV(SO₄²⁻) en RV(CO₃²⁻) [3], due aux espèces carbonates générées par l'activité bactérienne. Pour éviter cela, nous avons donc limité toute source de carbone en omettant le CO₂, pourtant préconisé, dans l'atmosphère de l'enceinte d'anaérobiose.

Dans cette seconde partie, plusieurs paramètres ont été modifiés afin de favoriser l'activité bactérienne. Pour cela, l'atmosphère de l'enceinte d'anaérobiose a été supplémentée en CO₂ (N₂ : 80 %, CO₂ : 10 %, H₂ : 10 %) un gaz considéré comme un élément important dans la croissance bactérienne. D'autre part, le milieu utilisé est le Postgate B (voir chapitre 2), où certains éléments pouvant influencer sur les mécanismes de transformation de la rouille verte ont été supprimés. Il s'agit notamment des phosphates, qui en s'adsorbant sur les cristaux de RV(SO₄²⁻), modifient sa réactivité [8,9], et ce même à de faibles concentrations. Notons que, pour la première série d'expériences, les phosphates du milieu Starkey avaient été conservés. Le milieu Postgate B contient une forte concentration en sulfates (cf. tableau 3.1.b), que nous avons maintenue, aux côtés de RV(SO₄²⁻), pour favoriser le développement des bactéries sulfato-réductrices. La quantité de sulfates apportée par ces composés autres que la rouille verte correspond à une concentration de $1,7 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ et est donc largement supérieure à la concentration en sulfates à l'équilibre avec la rouille verte dans la solution ($5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$).

L'inoculum est de $4 \times 10^2 \text{ CFU.mL}^{-1}$. Dans cette seconde partie, le suivi du développement bactérien a été fait par comptage des colonies sur géloses afin de confronter les résultats des deux méthodes différentes.

Enfin la concentration initiale en rouille verte a été diminuée ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$) afin de mettre en avant la modification du solide.

III.2 Suivi de la concentration bactérienne au cours du temps

L'évolution de la concentration bactérienne est présentée sur la figure 3.6.

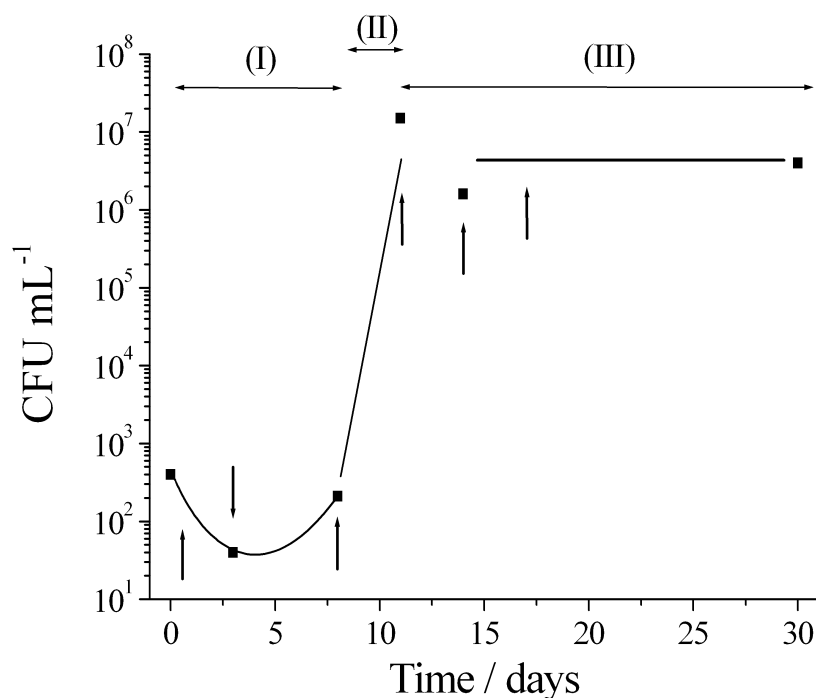


Figure 3.6 : Suivi de la concentration de *Desulfovibrio desulfuricans* en fonction du temps en présence de $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$, dans une suspension contenant des sulfates dissous en excès, avec une atmosphère contenant 10 % de CO_2 .

Trois phases peuvent être distinguées sur ce graphique. En phase I, entre 0 et 8 jours, aucune croissance n'est observée, la concentration de cellules cultivables descend d'abord jusqu'à 3×10^1 avant de revenir à environ 2×10^2 CFU.mL⁻¹. Pendant la phase II, on note une croissance rapide et importante telle que la concentration atteint une valeur d'environ 10^7 CFU.mL⁻¹. Enfin durant la phase III, la croissance est stoppée et la concentration cellulaire reste stable.

III.3 Résultats physico-chimiques

III.3.1 Micro-spectroscopie Raman

Les analyses Raman ont été effectuées à différentes périodes représentées sur la figure 3.6 par les flèches. Ces spectres sont donnés dans les figures 3.7 et 3.8 qui suivent :

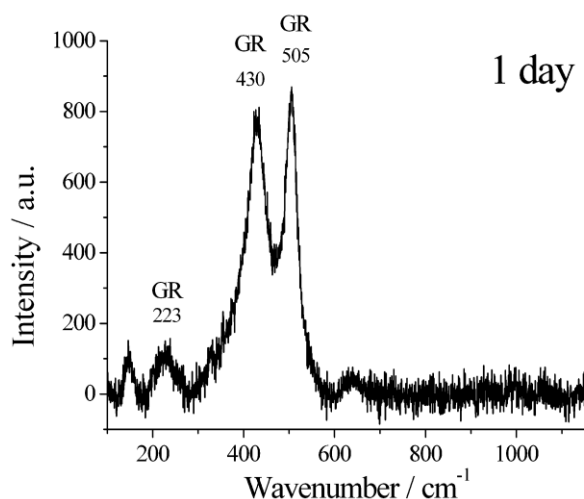
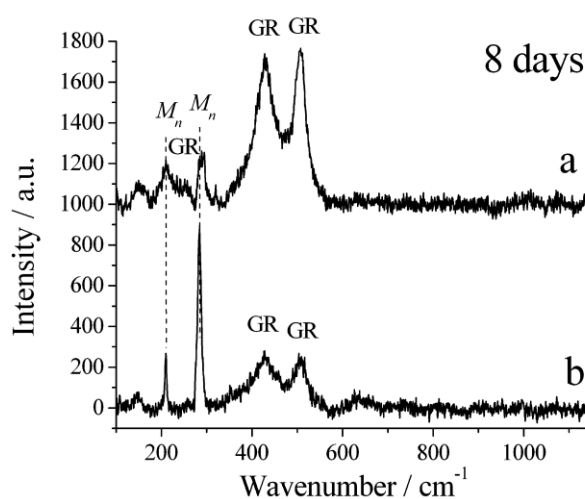
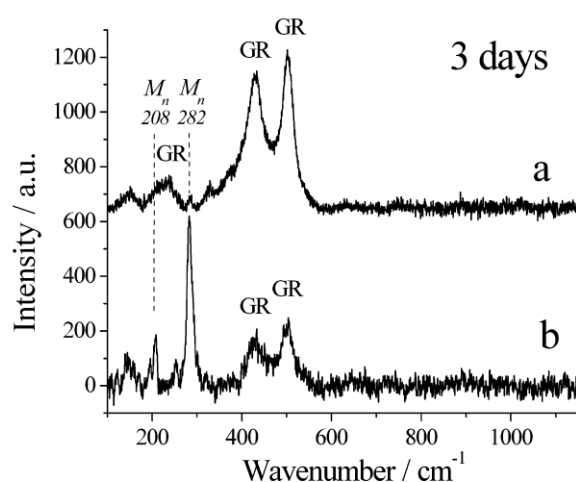


Figure 3.7 : Spectres Raman montrant l'évolution du précipité pendant la phase I lors de l'incubation du mélange $RV(SO_4^{2-})$ avec *Desulfovibrio desulfuricans*. Les pics Raman notés M_n sont ceux de la mackinawite nanocristalline et ceux notés GR sont ceux de la $RV(SO_4^{2-})$.



Un jour après l'inoculation des bactéries sulfato-réductrices dans le milieu, seule la rouille verte sulfatée est détectée. Après 3 jours, les bandes majoritaires restent celles de la rouille verte. Cependant, quelques bandes supplémentaires peuvent être détectées (spectre *a*). L'hétérogénéité du composé observée grâce au microscope optique du Raman a permis de pointer le laser sur des zones précises et ainsi obtenir le spectre *b*. Dans ce cas, les deux pics très faibles observés sur le spectre *a* sont alors clairement mis en évidence à 282 cm⁻¹ pour le

plus intense et 208 cm^{-1} pour le second. Ce spectre est celui de la mackinawite nanocristalline, précédemment considérée comme amorphe [5,10].

Après 8 jours, à la fin de la phase I, les pics de la mackinawite nanocristalline sont quelque soient les régions analysées, toujours associés à ceux de la rouille verte sulfatée. Ils apparaissent en outre plus intenses comme illustrés par le spectre *a*. Le spectre *b* a été obtenu en pointant sur une des régions les plus riches en FeS. Il confirme que le minéral biogénéré à ce stade est toujours la mackinawite nanocristalline.

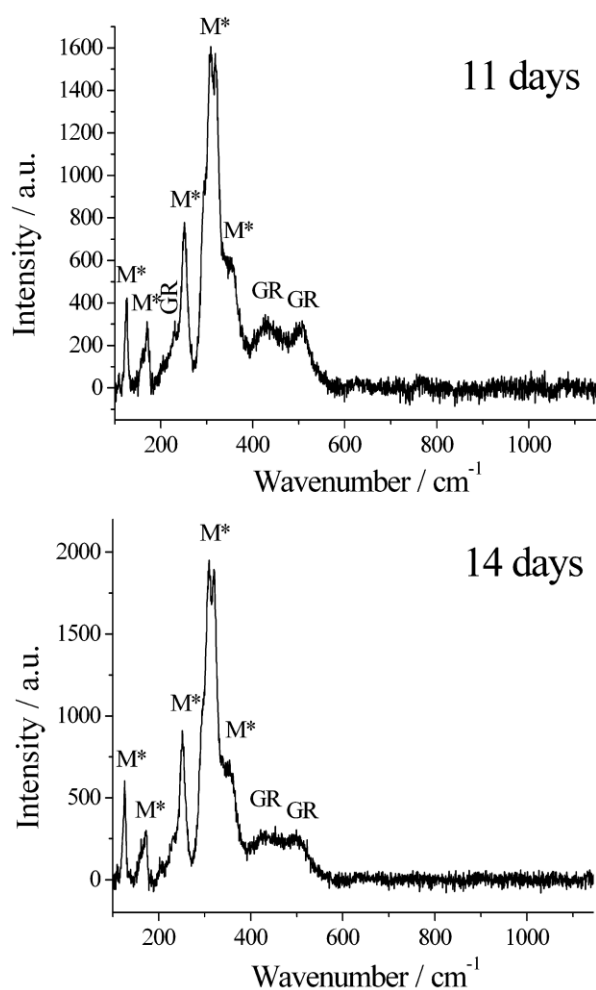
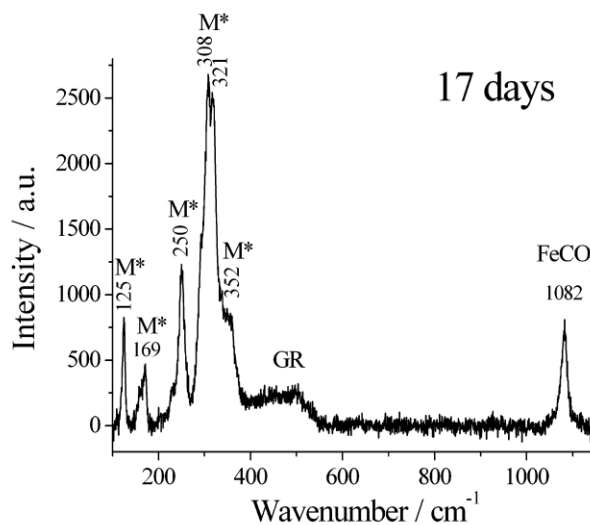


Figure 3.8 : Spectres Raman montrant l'évolution du précipité durant la phase III lors de l'incubation du mélange $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$ avec *Desulfovibrio desulfuricans*. Les pics Raman notés M* sont ceux de la mackinawite partiellement oxydée et ceux notés GR sont ceux de la $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$.



La figure 3.8 présente les spectres Raman obtenus durant la phase III, chacun représentatif de ceux obtenus aux jours 11, 14 et 17. Dans chaque cas les pics majoritaires sont ceux de la mackinawite partiellement oxydée. Les pics de la rouille verte sulfatée sont toujours visibles, mais proportionnellement d'intensité bien plus faible que sur les spectres relatifs à la phase I. Ceci montre qu'au cours de la phase II, où la croissance bactérienne est très rapide, une transformation partielle de la rouille verte s'est produite. L'intensité des pics

de $RV(SO_4^{2-})$ diminue encore entre les jours 11 et 17, ce qui indique que ce composé continue à se transformer progressivement.

Après 17 jours, les pics de rouille verte ne subsistent plus que sous la forme d'une large bosse tandis qu'un nouveau pic apparaît à 1082 cm^{-1} , traduisant la formation d'une nouvelle phase. Ce pic est caractéristique de la sidérite $FeCO_3$ [11]. La formation de sidérite est la conséquence de la présence de CO_2 dans l'atmosphère de l'enceinte d'anaérobiose.

Enfin la figure 3.9 représente l'analyse Raman effectuée parallèlement à la diffraction X à l'issue de l'expérience, c'est-à-dire 60 jours après l'inoculation.

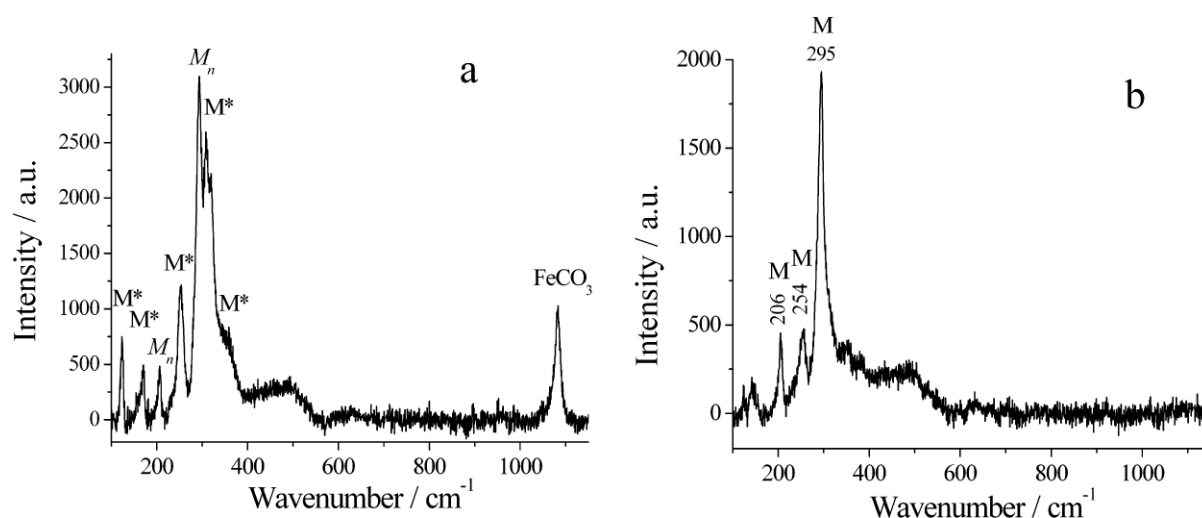


Figure 3.9 : Spectres Raman (a et b) du précipité à l'issue de l'expérience (60 jours). Les pics notés M, M^* et M_n sont ceux de la mackinawite, de la mackinawite partiellement oxydée et de la mackinawite nanocristalline, tandis que ceux notés GR sont ceux de la $RV(SO_4^{2-})$.

Deux spectres Raman caractéristiques des différents états physico-chimiques de la mackinawite [5] ont pu être obtenus de cet échantillon. Sur le spectre *a*, un mélange de mackinawite nanocristalline et de mackinawite oxydée est observé. De plus le pic principal de la sidérite est toujours visible. Une bosse aux environs de 500 cm^{-1} est aussi présente et pourrait correspondre à de la rouille verte sulfatée. Cependant cela ne peut être affirmé en s'appuyant uniquement sur le spectre Raman.

Le spectre *b* est typique de la mackinawite (c'est-à-dire $Fe^{II}S$) cristallisée, avec ses trois pics à 206, 254 et 295 cm^{-1} . Cette mackinawite est très probablement issue de la cristallisation des premières particules de mackinawite nanocristalline formées au début de l'expérience (cf. figure 3.6).

III.3.2 Diffraction des rayons X

Une analyse par diffraction des rayons X a été réalisée à la fin de l'expérience, c'est-à-dire 60 jours après inoculation (figure 3.10).

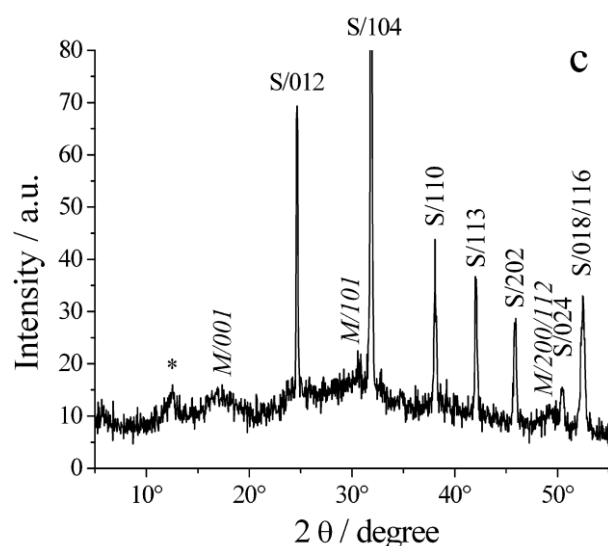


Figure 3.10 : Diffractogrammes de rayons X du précipité obtenu après 60 jours de vieillissement d'une suspension de rouille verte sulfatée et de bactéries *Desulfovibrio desulfuricans*. S/hkl et M/hkl sont respectivement les pics de diffraction de la sidérite et de la mackinawite, avec l'indice de Miller correspondant.

Les résultats de diffraction X permettent principalement de voir les pics fins de la sidérite. Des pics plus petits et plus larges attribuables à la mackinawite peuvent aussi être repérés, ce qui confirme que la mackinawite est toujours en cours de cristallisation.

Le résultat le plus important de cette figure est l'absence des pics de rouille verte car il démontre que la totalité de la rouille verte a été transformée en mackinawite et sidérite.

IV. Discussion

IV.1 Méthodes d'analyses et détection des sulfures de fer

Dans la première série d'expériences, la comparaison entre les informations obtenues par micro-spectroscopie Raman et diffraction des rayons X a mis en évidence des différences frappantes. En effet, sur les diffractogrammes, les pics caractéristiques de la rouille verte sulfatée sont intenses comparés à ceux de la mackinawite, alors que l'inverse est observé sur les spectres Raman. Il est probable qu'une quantité significative de mackinawite soit très mal cristallisée. Notons, que contrairement à la mackinawite $\text{Fe}^{\text{II}}\text{S}$, qui présente des spectres

Raman différents selon son degré de cristallisation, la mackinawite partiellement oxydée se caractérise toujours par le même spectre. Lors de l'étude antérieure relative aux interactions $RV(SO_4^{2-})$ / BSR [3], les sulfures de fer biogénérés n'ont d'ailleurs pas pu être détectés par diffraction des rayons X. De même, dans notre deuxième série d'expériences, le diffractogramme X obtenu ne révèle aucun pic de diffraction de $RV(SO_4^{2-})$, ce qui démontre que la transformation est totale ; malgré cela, les pics de la mackinawite sont à peine visibles. En fait, les deux méthodes se sont avérées pertinentes et complémentaires, chacune d'entre elles étant plus particulièrement sensible à l'un des deux composés impliqués.

Il est à noter que nous avons pu confirmer que l'analyse par diffraction des rayons X ne permettait pas de distinguer la mackinawite stœchiométrique $Fe^{II}S$ de la mackinawite partiellement oxydée $Fe^{II}_{1-3x}Fe^{III}_{2x}S$, alors que la spectroscopie Raman distingue clairement les deux situations.

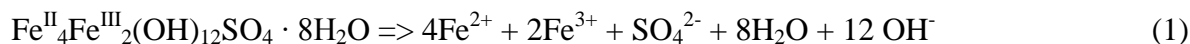
IV.2 Le système rouille verte sulfatée / bactéries sulfato-réductrices / mackinawite

Les analyses de couches de rouilles formées sur aciers après 6 à 12 mois d'immersion en eau de mer sur différents site portuaires ont montré que la partie interne, près du métal, était faite de rouille verte sulfatée et de sulfures de fer et colonisée par les bactéries sulfato-réductrices [7]. Dans un travail précédent traitant des interactions entre rouille verte sulfatée et bactéries sulfato-réductrices [3], le sulfure de fer n'était pas le seul composé biogénéré, puisque la rouille verte carbonatée et de la vivianite $Fe_3(PO_4)_2 \cdot 8H_2O$ étaient aussi produites. De plus, le sulfure de fer obtenu était la greigite (Fe_3S_4), qui n'a pas été retrouvée dans les couches de rouilles en milieu marin [7].

Dans notre première série d'expériences, il a été démontré que le sulfure de fer peut être le seul produit formé dans un système comprenant la rouille verte sulfatée comme seule source de sulfates. Dans ce système, aucune source de carbonate exogène n'était présente et le fer dissous devait précipiter avec les sulfures. Une lente croissance des BSR a été observée et la transformation de la rouille verte a été seulement partielle après 30 jours.

Plusieurs études ont démontré que les bactéries sulfato-réductrices pouvaient réduire les ions sulfates issus de minéraux [7, 12, 13]. Les résultats montrent également que la dissolution du minéral se déroule avant la réduction des sulfates. Dans la première partie, la concentration d'ions $Fe(II)$ dissous et d'espèces sulfates était contrôlé par les conditions d'équilibre. Cette concentration a été estimée à environ $5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. La croissance

bactérienne a dès lors consommé le sulfate dissous, ce qui a modifié les conditions d'équilibre et induit ainsi la dissolution progressive de la rouille verte sulfatée, qui conduit au départ dans la solution de 4 ions Fe^{2+} et 2 ions Fe^{3+} pour 1 ion SO_4^{2-} :



La réduction d'un sulfate par les bactéries produit alors 1 S^{2-} qui peut précipiter avec 1 Fe^{2+} pour former du sulfure de fer. Ce procédé laisserait un excès de 3 Fe^{2+} et 2 Fe^{3+} en solution. Le fer divalent Fe(II) pourrait rester sous forme dissoute en solution mais cela semble plus improbable pour le Fe(III) et la formation de composé à base de Fe(III) pouvait être attendue. Cependant, de tels composés n'ont pas été trouvés. La seule phase observée contenant des Fe(III) a été la mackinawite partiellement oxydée $\text{Fe}^{\text{II}}_{1-3x}\text{Fe}^{\text{III}}_{2x}\text{S}$. Dans l'étude antérieure traitant de la bioréduction de la rouille verte sulfatée [3], le sulfure de fer obtenu était la greigite Fe_3S_4 , un composé contenant majoritairement du Fe(III) ; sa formule peut d'ailleurs s'écrire $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}_2\text{S}_4$. La formation de ce minéral a probablement été induite par la présence d'oxyhydroxydes contenant du Fe(III) aux côtés de la rouille verte en début d'expérience [3].

Les produits résultants du mélange de Fe(II) et du Fe(III) dissous avec une solution de sulfure de sodium ont été étudiés récemment [5]. Un mélange de mackinawite nanocristalline, de soufre élémentaire $\alpha\text{-S}_8$ et de mackinawite partiellement oxydée $\text{Fe}^{\text{II}}_{1-3x}\text{Fe}^{\text{III}}_{2x}\text{S}$ a été obtenue. Ce résultat prouve que deux réactions se déroulent simultanément :

- (i) la réduction du Fe(III) par les sulfures qui produit du Fe(II) et du soufre élémentaire.
- (ii) La coprécipitation du Fe(II) et Fe(III) avec les sulfures qui conduit à la formation de la mackinawite partiellement oxydée $\text{Fe}^{\text{II}}_{1-3x}\text{Fe}^{\text{III}}_{2x}\text{S}$.

Il apparaît donc que les espèces Fe(II) et Fe (III) dissoutes ont réagi de façon similaire avec les sulfures produits par les bactéries sulfato-réductrices dans notre expérimentation : une partie des cations Fe(III) ont été incorporés dans la mackinawite oxydée tandis qu'une autre partie a été réduite en Fe(II). Le soufre élémentaire n'a pas été détecté, ce qui implique que les sulfures ont été oxydés sous une autre forme, dissoute, par exemple des polysulfures.

IV.3 Bioréduction de la rouille verte sulfatée dans un environnement riche en sulfates et en présence de CO₂

Dans la seconde partie, les conditions physico-chimiques pour la croissance bactérienne ont été drastiquement différentes. La transformation de la rouille verte initiale a de plus été intégrale. Trois phases de la croissance bactérienne ont été mises en évidence, et la nature des sulfures de fer biogénérés s'est avérée dépendre de ces phases. Au début du processus (phase I), de la mackinawite nanocristalline a été produite. Durant cette période, la suspension contenait une grande quantité de sulfates dissous, la rouille verte n'a donc pas été impliquée dans la bioréduction des sulfates et ne s'est donc pas dissoute. Les Fe(III) n'étaient donc pas présents en solution et le sulfure de fer a précipité uniquement à partir du Fe(II) dissous.

La vitesse de croissance a ensuite augmenté durant la phase II puisque la concentration cellulaire est passée de 10^2 à 10^7 CFU.mL⁻¹ en 3 jours. Parallèlement, la précipitation de FeS a conduit à une diminution de la concentration en Fe(II) dissous. La suspension n'était alors plus saturée en regard de la rouille verte sulfatée qui a donc commencé à se dissoudre. A ce stade, du Fe(III) a alors été produit dans la solution et la mackinawite partiellement oxydée a commencé à se former.

Pour finir, comme la composition de la rouille verte sulfatée est $\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{SO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, sa dissolution produit 1 SO_4^{2-} pour 6 cations Fe (réaction 1). La réduction de ce sulfate en sulfure conduit à la précipitation en FeS et laisse 5 cations Fe en solution. Comme le CO₂ contenu dans l'atmosphère a produit des carbonates en solution, ces cations Fe ont pu alors précipiter avec les ions carbonates sous forme de FeCO₃. Une fois encore, on peut noter que les composés comportant du Fe(III) n'ont pas été détectés. Le Fe(III) est seulement présent dans la mackinawite oxydée. Contrairement aux précédents travaux [3], la rouille verte carbonatée ne se forme pas. Cette divergence doit être due au fait que lors de cette étude antérieure, le système contenait à la fois de la rouille verte sulfatée et de la lépidocrocite, ce qui fournit une plus grande quantité de Fe(III).

La seconde série d'expériences confirme donc les résultats exposés dans la première partie, à savoir qu'une partie du Fe(III) est réduit en Fe(II) par les espèces soufrées, prévenant ainsi la formation de composés de Fe(III) et d'autres rouilles vertes, carbonatées ou chlorurées, alors que le reste du Fe(III) conduit à la formation de mackinawite oxydée.

V. Conclusion

Cette étude a permis de confirmer que la rouille verte sulfatée pouvait constituer une source de sulfates pour alimenter la respiration anaérobie des bactéries sulfato-réductrices [3]. De plus, il a été démontré que les bactéries pouvaient se développer, c'est-à-dire que la concentration bactérienne pouvait augmenter, alors que la principale source de sulfates était la rouille verte sulfatée. Ces résultats sont à mettre en regard de l'association rouille verte sulfatée / bactéries sulfato-réductrices / sulfures de fer systématiquement observée au sein des couches de rouille sur des coupons métalliques immergés eau de mer sur différents sites portuaires [7]. Ils montrent en effet que l'accumulation de rouille verte sulfatée, résultat des processus électrochimiques de la corrosion de l'acier dans l'eau de mer, permet de constituer un réservoir de sulfates pour les BSR qui, ultérieurement, viendraient coloniser les zones internes de la couche de rouille. De ce fait, le développement des BSR et donc la formation d'espèces sulfures seraient favorisés.

Lorsque les BSR se développent, la rouille verte se dissout progressivement. Si les ions Fe^{2+} produits par la dissolution du métal précipitent avec les sulfures pour former de la mackinawite à la surface du métal, alors la rouille verte formée durant les stades précoces de la corrosion n'est pas renouvelée, et est donc entièrement consommée. De fait, dans les conditions les plus favorables au développement des BSR considérées dans notre étude, c'est-à-dire lorsque du dioxyde de carbone et des sulfates dissous étaient présents, l'activité métabolique des bactéries sulfato-réductrices a conduit à la transformation totale de la rouille verte en mackinawite et sidérite.

Cependant, les bactéries sulfato-réductrices peuvent être associées à des bactéries ferri-réductrices (BFR). De récentes études ont montrées que de la rouille verte sulfatée pouvait être bio-générée par la réduction d'oxyhydroxydes de Fe^{III} par de tels micro-organismes [14,15]. L'activité métabolique des BFR pourrait donc renouveler de manière plus ou moins continue la rouille verte sulfatée dans la couche de rouille. Cette possibilité suggère de nouveau que l'association de différents types de bactéries et de métabolismes bactériens pourrait avoir une influence sur l'évolution du système de corrosion.

Pour finir, on peut noter que dans les travaux antérieurs [3], la greigite était le seul sulfure de fer identifié bio-généré par la transformation de la rouille verte sulfatée. Avec les conditions expérimentales utilisées dans notre étude, la mackinawite a été le minéral produit à partir de la rouille verte, comme observé sur sites [7]. Cette mackinawite contenait cependant du Fe(III) . La formation de cette mackinawite partiellement oxydée semble en tout cas

témoigner de la bioréduction de la rouille verte sulfatée par les bactéries sulfato-réductrices. En effet, les cations Fe(III) que contient ce composé proviennent de la dissolution de la rouille verte induite par la consommation des sulfates par les BSR.

Références :

- [1] M. Langumier, R. Sabot, R. Obame-Ndong, M. Jeannin, S. Sablé, Ph. Refait, *Formation of Fe(III)-containing mackinawite from hydroxysulphate green rust by sulphate reducing bacteria*, Corros. Sci. **51** (2009) p. 2694-2702.
- [2] Ph. Refait, J.-B. Memet, C. Bon, R. Sabot, et J.-M. R. Génin, *Formation of the Fe(II)-Fe(III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel*, Corros. Sci. **45** (2003) p. 833-845.
- [3] A. Zegeye, L. Huguet, M. Abdelmoula, C. Carteret, M. Mullet, F. Jorand, *Biogenic hydroxysulfate green rust, a potential electron acceptor for SRB activity*, Geochim. Cosmochim. Acta **71** (2007) p. 5450-5462.
- [4] R. Sabot, M. Jeannin, M. Gadouleau, Q. Guo, E. Sicre, Ph. Refait, *Influence of lactate ions on the formation of rust*, Corros. Sci. **49** (2007) p. 1610-1624.
- [5] J.A. Bourdoiseau, M. Jeannin, R. Sabot, C. Rémaizeilles, Ph. Refait, *Characterisation of mackinawite by Raman spectroscopy: effects of crystallisation, drying and oxidation*, Corros. Sci. **50** (2008) p. 3247-3255.
- [6] M. Mullet, S. Boursiquot, M. Abdelmoula, J.-M. Génin, J.-J. Ehrhardt, *Surface chemistry and structural properties of mackinawite prepared by reaction of sulfide with metallic iron*, Geochim. Cosmochim. Acta **66** (2002) p. 829-836.
- [7] S. Pineau, R. Sabot, L. Quillet, M. Jeannin, Ch. Caplat, I. Dupont-Morral, Ph. Refait, *Formation of the Fe(II-III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel associated to molecular detection of dissimilatory sulphite-reductase*, Corros. Sci. **50** (2008) p. 1099-1111.
- [8] F. Bocher, A. Géhin, C. Ruby, J. Ghanbaja, M. Abdelmoula, J.-M.R. Génin, *Coprecipitation of Fe(II-III) hydroxycarbonate green rust stabilised by phosphate adsorption*, Sol. State Sci. **6** (2004) p. 117-124.
- [9] Ph. Refait, M. Reffass, J. Landoulsi, R. Sabot, M. Jeannin, *Role of phosphate species during the formation and transformation of the Fe(II-III) hydroxycarbonate Green Rust*,

Colloids and Surfaces A **299** (2007) p. 29-37.

[10] A. Boughriet, R.S. Figueiredo, J. Laureyns, P. Recourt, *Identification of newly generated iron phases in recent anoxic sediments: ^{57}Fe Mossbauer and micro-Raman spectroscopic studies*, J. Chem. Soc., Faraday Trans. **93** (1997) p. 3209-3215.

[11] M.C. Bernard, S. Duval, S. Joiret, M. Keddam, F. Ropital, H. Takenouti, *Analysis of corrosion products beneath an epoxy-amine varnish film*, Prog. Org. Coat. **45** (2002) p. 339-404.

[12] O.V. Katrnachuk, S.Y. Kurochkina, O.H. Tuovinen, *Growth of sulfate-reducing bacteria with solid-phase electron acceptor*, Appl. Microbiol. Biotechnol. **58** (2002) p. 482-486.

[13] W. Kowalski, W. Holub, D. Wolicka, M. Przytocka-Jusiak, M. Blasczyk, *Sulphur balance in anaerobic cultures of microorganisms in medium with phosphogypsum and sodium lactate*, Archiwum Mineralogiczne (2003) p. 33-40.

[14] A. Zegeye, G. Ona-Nguema, C. Carteret, L. Huguet, M. Abdelmoula, F. Jorand, *Formation of hydroxysulphate green rust 2 as a single iron(II-III) mineral in microbial culture*, Geomicrobiology Journal **22** (2005) p. 1-11.

[15] J. Duan, S. Wu, X. Zhang, G. Huang, M. Du, B. Hou, *Corrosion of carbon steel influenced by anaerobic biofilm in natural seawater*, Electrochim. Acta **54** (2008) p. 22-28.

Chapitre 4 : Évolution de la diversité bactérienne et des produits de corrosion présents sur des coupons d'acier au carbone après 7 jours à 2 mois d'immersion en milieu marin

Afin de mieux comprendre les phénomènes de corrosion en milieu naturel, il est indispensable de comparer l'état d'avancement de la corrosion du métal en fonction de la flore bactérienne présente au moment t , et d'interpréter l'influence que peut alors avoir la flore bactérienne sur le processus de corrosion. Réciproquement, comme nous l'avons montré au chapitre précédent, il semble aussi indispensable de relier l'évolution de la flore bactérienne à celle des propriétés de la couche de rouille et notamment à la nature des phases présentes. C'est pour cette raison que nous avons décidé d'immerger des coupons d'acier dans le port des Minimes de La Rochelle et de caractériser simultanément, pour différentes durées d'exposition, les produits de corrosion de l'acier et la flore microbienne associée.

I. Conditions initiales

Comme décrit dans le chapitre 2, les coupons immergés dans le port des Minimes de La Rochelle pendant une durée variant de 1 semaine à 2 mois sont récupérés et leur analyse débute aussitôt. En effet, il est impératif de limiter les modifications de l'échantillon tant au niveau de l'acier (oxydation des produits de corrosion) que de la flore présente (sensibilité à l'oxygène de la flore anaérobie, contaminations). De ce fait, une première fraction des échantillons est analysée immédiatement par micro-spectroscopie Raman, une seconde fraction est utilisée pour mettre en culture la flore présente et enfin le reste est congelé (-80 °C) pour des analyses complémentaires et notamment l'étude de la flore totale. Ce chapitre présentera tout d'abord les résultats des analyses physico-chimiques avant de s'intéresser aux résultats microbiologiques. Les résultats relatifs à la densité bactérienne seront présentés avant l'étude de la diversité bactérienne effectuée grâce à la biologie moléculaire.

II. Analyse des produits de corrosion du biofilm composite « micro-organismes / produits de corrosion »

Une fois les prélèvements effectués et répartis pour les différentes parties de l'étude, une coupe transversale du biofilm composite « micro-organismes/produits de corrosion » a été réalisée afin de pouvoir observer la stratification de la couche de rouille. Celle-ci est en effet le plus souvent constituée de plusieurs strates, les composés à base de Fe(II) se trouvant à l'interface métal/couche de rouille et les produits à base de Fe(III) à l'interface couche de rouille/milieu marin. Effectuer une coupe transversale de l'échantillon permet une analyse précise de chacune de ces strates par micro-spectroscopie Raman. Les résultats sont détaillés dans ce paragraphe en fonction du temps d'immersion. Il est à noter que la couche de produits de corrosion n'est pas uniquement minérale mais associée à un biofilm microbien. On parlera donc d'une couche composite « micro-organismes / produits de corrosion », également appelé « biofilm » dans notre texte.

II.1. Analyse après 7 jours d'immersion

La couche de corrosion après 7 jours est assez fine. Malgré cela, l'examen macroscopique de l'échantillon a permis de distinguer trois strates, une mince couche orange en surface suivie d'une couche intermédiaire marron et enfin une couche noire interne. Les résultats de l'analyse en micro-spectroscopie Raman sont exposés dans la figure 4.1.

La couche orange de surface est exclusivement composée de lépidocrocite (L). Le spectre de la couche marron, intermédiaire, révèle la présence de trois composés, la lépidocrocite (L), la rouille verte (RV) et la magnétite (M). Enfin la partie la plus interne, la couche noire, est formée par de la lépidocrocite (L) ainsi que de la rouille verte (RV). Les bandes Raman de cette rouille verte sont situées à environ 220, 435 et 510 cm^{-1} , ce qui est caractéristique de la rouille verte sulfatée plutôt que de la rouille verte chlorurée [1,2].

Ce résultat confirme ce qui a pu être déduit des analyses effectuées sur des coupons d'acier immergés pendant 6 et 12 mois dans différents ports français [3,4]. La rouille verte sulfatée est le premier produit solide généré par le processus de corrosion. Sensible à l'action de l'oxygène, la rouille verte est oxydée par le dioxygène dissous en lépidocrocite. Notons que la magnétite peut se former soit directement à partir du métal soit, comme la lépidocrocite, par oxydation de la rouille verte. En effet, la lépidocrocite est le produit

d'oxydation des rouilles vertes en présence de forts flux d'oxygène, la magnétite se formant à l'inverse dans des milieux appauvris en oxygène [5]. La magnétite est présente essentiellement dans la couche intermédiaire, ce qui indique qu'elle provient plutôt d'une oxydation de la rouille verte. De ce fait, sa présence aux côtés de la lépidocrocite pourrait donc déjà traduire l'existence de zones aérées et de zones plus faiblement aérées au sein de la couche de rouille.

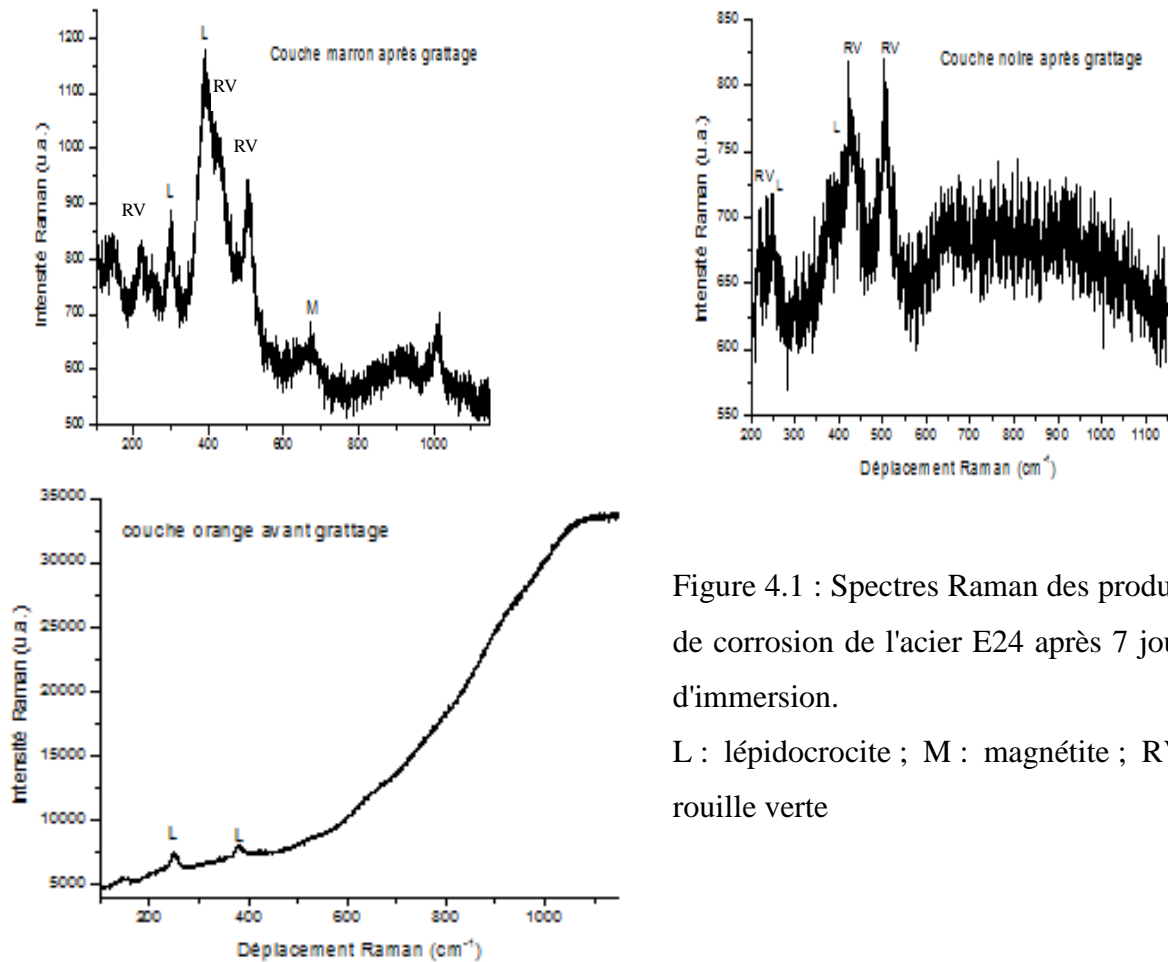


Figure 4.1 : Spectres Raman des produits de corrosion de l'acier E24 après 7 jours d'immersion.

L : lépidocrocite ; M : magnétite ; RV : rouille verte

II.2. Analyse après 15 jours d'immersion

Après 15 jours d'immersion, la couche de corrosion est encore relativement fine et composée de deux phases, l'une orange et l'autre noire.

Les spectres Raman obtenus (figure 4.2) lors de l'analyse de la couche noire révèlent la présence de lépidocrocite (L) ainsi que de rouille verte (RV). La goethite (G) et la magnétite (M) ont également été parfois identifiées dans cette zone. La couche orange révèle la présence de lépidocrocite et de magnétite.

Le processus de corrosion suit donc son cours. La rouille verte sulfatée est produite à la surface de l'acier puis oxydée en différents composés à base de Fe(III), et principalement la lépidocrocite γ -FeOOH. La magnétite est de nouveau observée. La goethite est maintenant aussi présente. Elle est, comme Fe_3O_4 et γ -FeOOH, un des produits communs de l'oxydation des rouilles vertes. Sa formation dépend elle aussi de la cinétique d'oxydation, c'est-à-dire du flux d'oxygène, mais également d'autres paramètres tels que température, concentration en Fe(II) dissous et pH notamment [5].

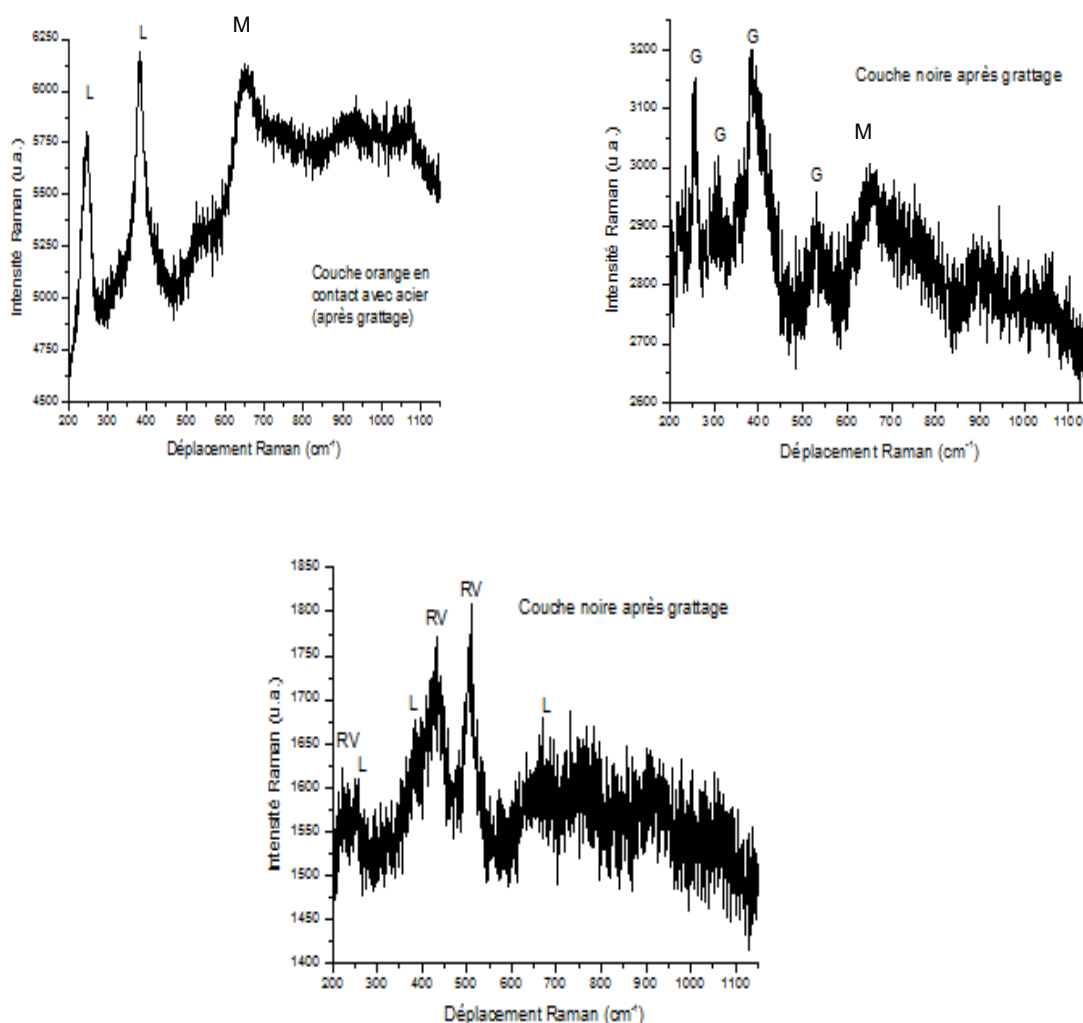


Figure 4.2 : Spectres Raman des produits de corrosion de l'acier E24 après 15 jours d'immersion. L : lépidocrocite ; M : magnétite ; G : goethite ; RV : rouille verte

II.3. Analyse après 1 mois d'immersion

On constate que la couche de produits de corrosion est nettement plus épaisse que celles ayant recouvert les coupons immergés durant des temps plus courts. L'examen macroscopique de la couche externe montre une coloration orange tandis que la couche en contact avec le métal est noire. Les spectres Raman sont présentés sur la figure 4.3. L'analyse Raman a permis de mettre en évidence 4 strates successives. La partie la plus externe (« orange extérieure ») est essentiellement composée de goethite (G). Puis vient une couche intermédiaire brun-rouge formée de lépidocrocite (L). Enfin, dans la couche noire, la rouille verte (RV) prédomine. Cependant, un spectre a mis en évidence la présence de sulfures de fer (FeS) au contact du métal.

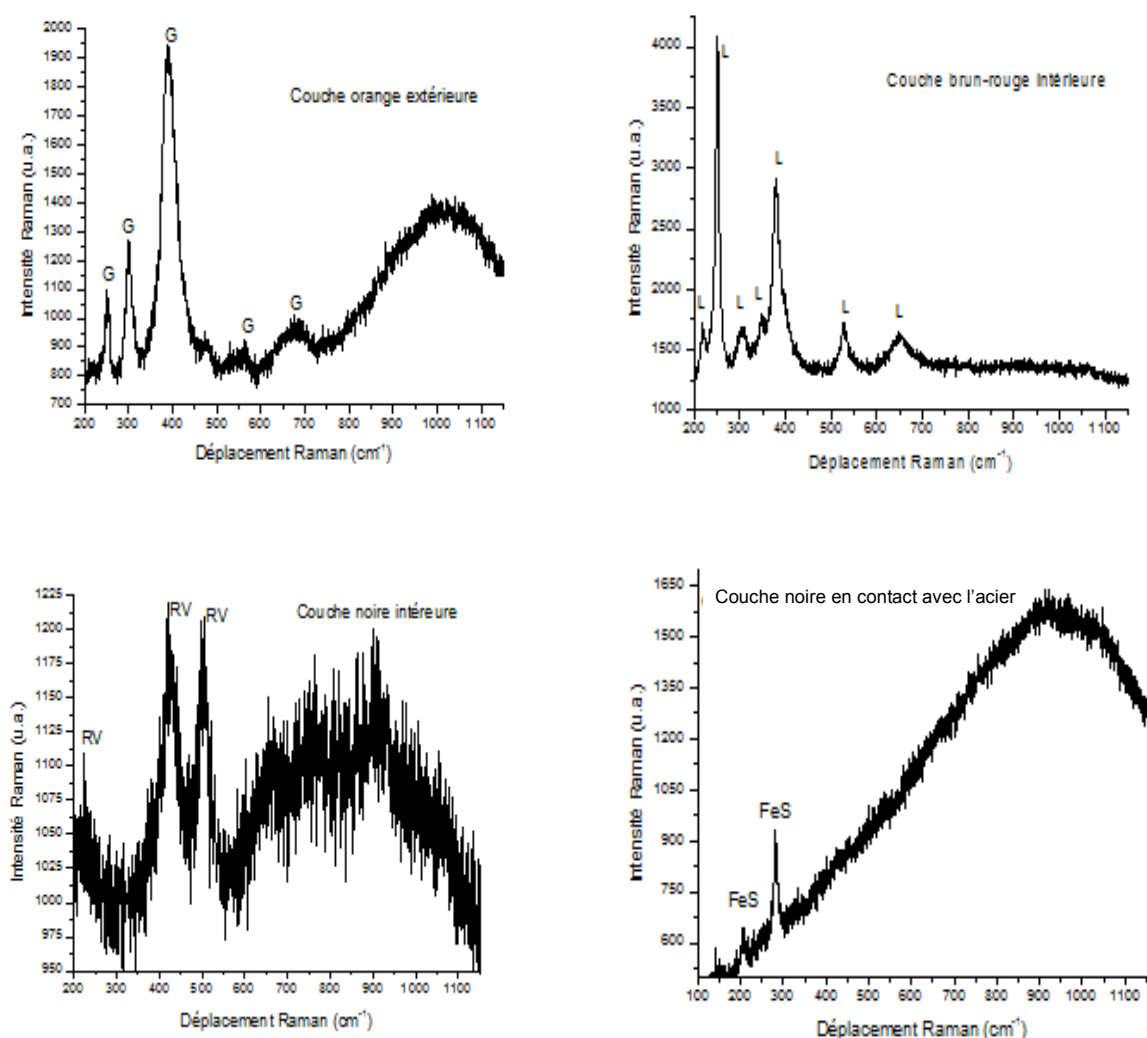
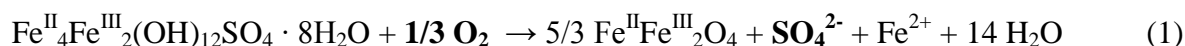


Figure 4.3 : Spectres Raman des produits de corrosion de l'acier E24 après 1 mois d'immersion. G : goethite ; L : lépidocrocite ; RV : rouille verte

Plus précisément, ce spectre, constitué de 2 pics à environ 207 et 282 cm^{-1} , est celui de la mackinawite nanocristalline [6]. Cette forme est celle sous laquelle la mackinawite précipite à partir de Fe(II) et S(-II) dissous [7,8]. Elle peut évoluer plus ou moins vite vers une forme mieux cristallisée, en fonction de différents paramètres, notamment le pH et la température.

Quoiqu'il en soit, la présence de ce sulfure de fer indique qu'après 1 mois d'immersion, des zones, a priori encore rares, de la couche de rouille, ont déjà été colonisées par des bactéries sulfato-réductrices (BSR). En milieu marin, où le soufre est présent uniquement sous forme de sulfates, la présence de sulfures résulte a priori de l'activité métabolique de BSR.

Nous avons signalé plus haut que la présence conjointe de lépidocrocite et de magnétite pouvait laisser supposer la présence de zones plus ou moins aérées. En suivant cette hypothèse, ce serait alors dans les zones les plus appauvries en oxygène que les BSR, bactéries anaérobies, pourraient se développer en premier lieu. L'oxydation de la rouille verte sulfatée en magnétite, consommant de l'oxygène et produisant des sulfates libres, aurait en outre tendance à favoriser le développement des BSR, suivant la réaction :



Note : la réaction a été écrite en supposant que les ions sulfates produits étaient accompagnés d'une quantité égale d'ions Fe^{2+} , comme observé expérimentalement lors de la transformation de la rouille verte sulfatée en lépidocrocite [9].

II.4. Analyse après 2 mois d'immersion

Le coupon d'acier immergé pendant 2 mois présente comme le précédent une couche de produits de corrosion importante. Les spectres Raman obtenus sont donnés sur la figure 4.4.

Le premier spectre issu de la couche la plus externe (couche brune sans grattage) présente uniquement de la goethite ainsi qu'une forte fluorescence probablement due à la présence du biofilm ou plus généralement de matière organique. Au niveau de la couche brun-noire, légèrement plus en profondeur, on distingue deux types de zones, la première composée de lépidocrocite, la seconde contenant goethite et rouille verte sulfatée. Enfin, la couche noire en contact avec l'acier contient essentiellement de la rouille verte. De plus, la goethite et la lépidocrocite sont présentes sous forme de traces dans la couche en contact avec le métal. En

revanche, nous n'avons pas retrouvé de sulfures de fer, contrairement au coupon immergé 1 mois. La colonisation de la couche de rouille par les BSR reste encore très limitée de sorte que les régions colonisées, peu nombreuses et peu étendues, peuvent ne pas être détectées.

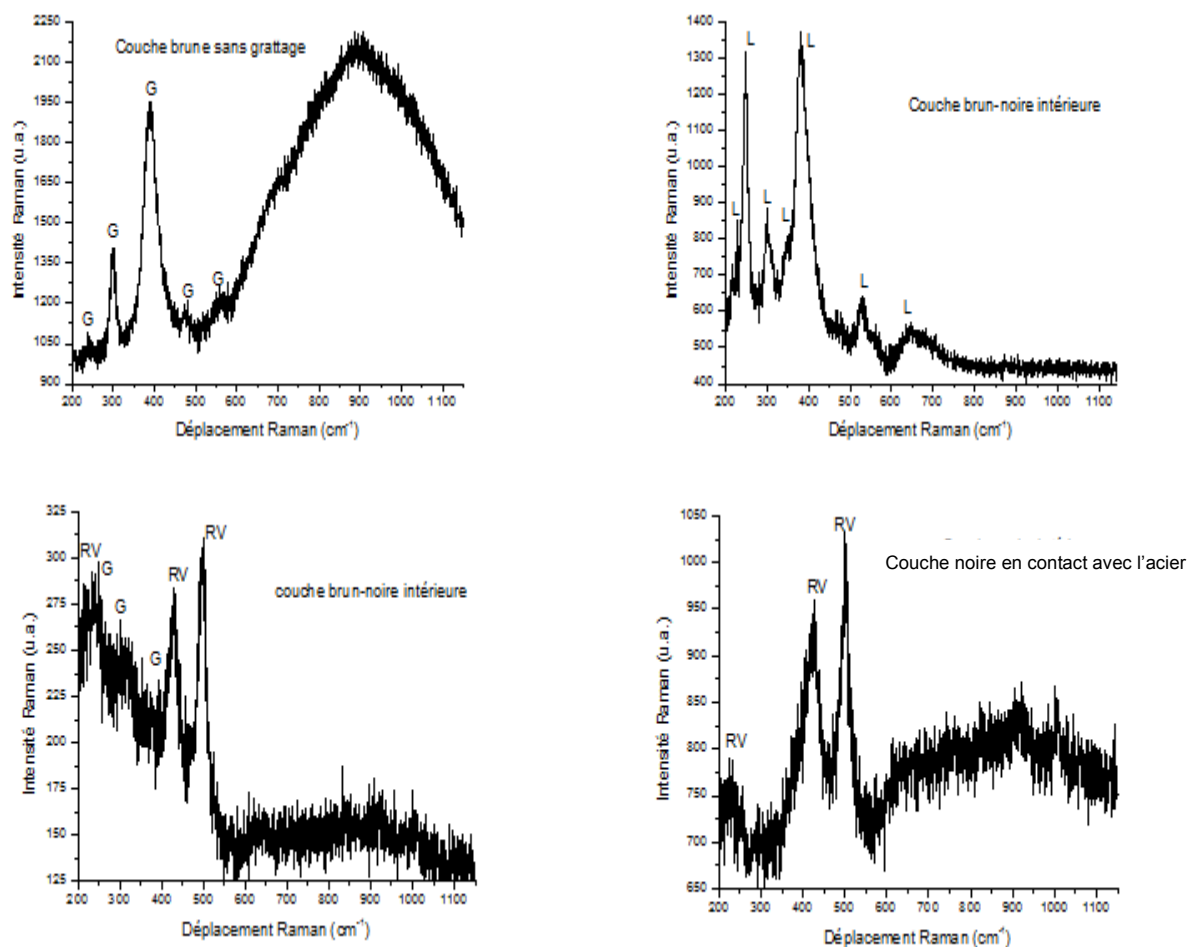


Figure 4.4 : Spectres Raman des produits de corrosion de l'acier E24 après 2 mois d'immersion. G : goethite ; L : lépidocrocite ; RV : rouille verte

II.5. Conclusion

En vertu des travaux antérieurs les plus récents [3,4], les sulfures de fer sont systématiquement présents dans la couche de rouille après 6 mois d'exposition. Ils forment, sous la rouille verte sulfatée et ses produits d'oxydation, une couche recouvrant la totalité de la surface du métal. La corrosion est alors sans ambiguïté influencée par les BSR.

Les résultats obtenus ici indiquent que les sulfures de fer n'apparaîtraient pas avant le premier mois d'immersion. Les produits de corrosion se formant alors sont ceux résultant du processus de corrosion électrochimique du fer en milieu marin, c'est-à-dire la rouille verte sulfatée et les produits de son oxydation. A partir d'un mois d'immersion, des sulfures de fer

peuvent être détectés localement. Dans cette période de transition, deux processus vont coexister, le processus « abiotique », conduisant à la formation de rouille verte sulfatée, et le processus « induit par les BSR », conduisant à FeS. C'est à ce moment-là que le système de corrosion se caractériserait par de fortes hétérogénéités, propices au développement de phénomènes de corrosion localisée.

Nous allons maintenant nous intéresser à la partie microbiologique de l'étude.

III. Analyses microbiologiques et moléculaires de la couche composite « micro-organismes / produits de corrosion »

III.1. Abondance bactérienne

III.1.1. Estimation du nombre total de bactéries

La flore bactérienne totale a été dénombrée par marquage au fluorochrome DAPI et les échantillons ont ensuite été observés en microscopie à épifluorescence. Les résultats sont présentés sur la figure 4.5.

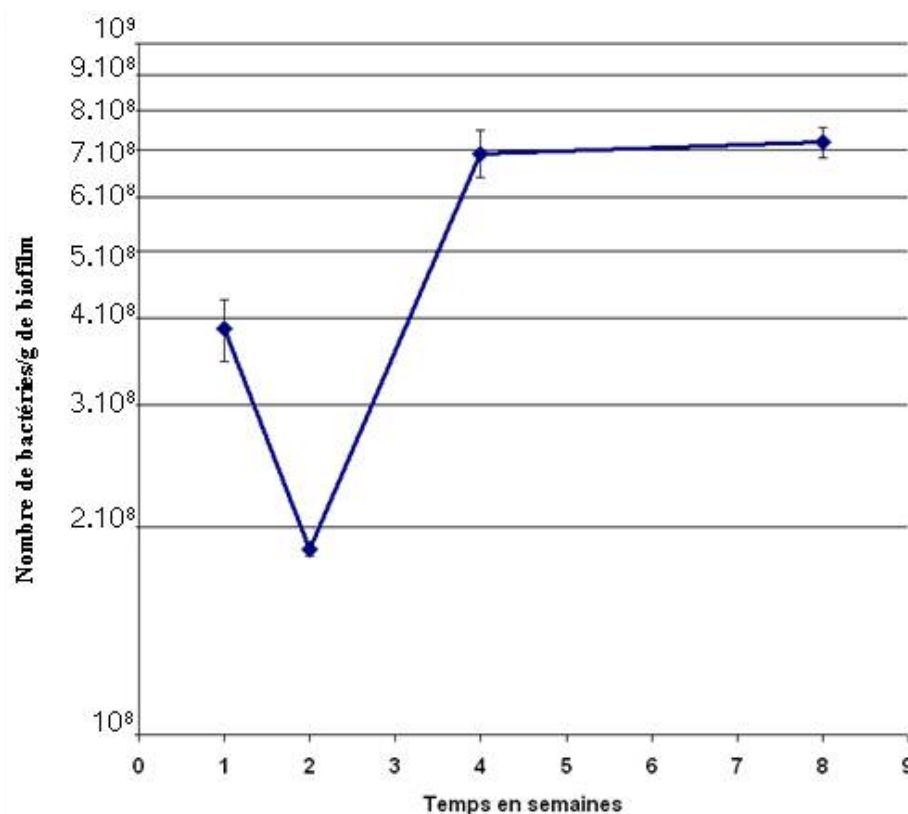


Figure 4.5 : Évolution de la flore bactérienne totale en fonction du temps d'immersion.

On constate que l'abondance bactérienne totale du biofilm (couche composite « micro-organismes / produits de corrosion ») est forte quel que soit le temps d'immersion. La densité bactérienne a évolué d'environ 4.10^8 à $7,2.10^8$ bactéries/g de biofilm. Après une légère diminution du nombre de bactéries durant les deux premières semaines d'immersion, la concentration bactérienne totale tend à augmenter avec le temps d'immersion. L'augmentation de la flore totale est cependant minime puisque que la densité bactérienne demeure dans le même ordre de grandeur.

III.1.2. Estimation du nombre de bactéries cultivables

La méthode de dénombrement en surface d'un milieu gélosé a permis d'obtenir les résultats présentés sur la figure 4.6 concernant les bactéries cultivables. Les bactéries aérobies ont été dénombrées sur le milieu de culture « marine agar » (MA), milieu riche permettant la croissance de nombreuses bactéries marines. Ce même milieu a été utilisé pour le dénombrement des bactéries anaérobies ainsi que le milieu « Baar », milieu sélectif des bactéries sulfato-réductrices.

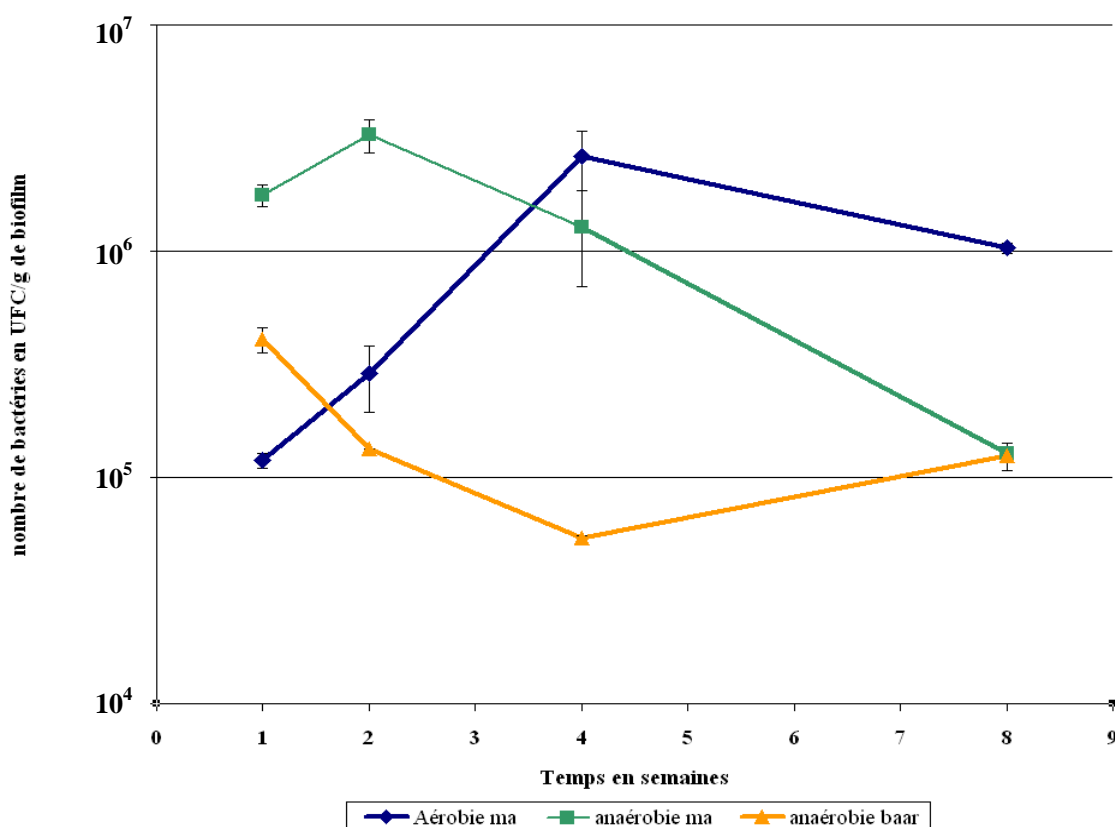


Figure 4.6 : Evolution du nombre de bactéries cultivables/g de biofilm en fonction du temps d'immersion, des conditions d'oxygénation et du milieu de culture (ma = milieu de culture « marine agar », baar = milieu de culture de Baar modifié pour réducteurs de sulfates).

En condition aérobie, le nombre de bactéries cultivées sur MA tend à augmenter, ce qui concorde avec la phase de « croissance » du biofilm bactérien. Entre 1 et 4 semaines, les dénombrements passent de $1,2 \cdot 10^5$ UFC/g de biofilm à $2,6 \cdot 10^6$ UFC/g de biofilm. En revanche, la concentration bactérienne, dans ce même milieu, en condition anaérobie, diminue au cours des deux premiers mois, passant de $3,2 \cdot 10^6$ à $1,3 \cdot 10^5$ UFC/g de biofilm. En condition anaérobie avec le milieu « Baar », la densité bactérienne varie légèrement entre $5,4 \cdot 10^4$ et $4,1 \cdot 10^5$ UFC/g de biofilm. Au cours des processus de formation des biofilms, les données concernant l'adhésion des micro-organismes aux produits de corrosion dans les premières phases d'immersion d'un acier au carbone ne sont pas identifiées. Néanmoins, il est probable que des forces d'adhésion irréversibles sur les produits de corrosion soient mises en œuvre lors des colonisations bactériennes, rendant ainsi les bactéries moins disponibles à la culture en milieu gélosé. En effet, nous avons montré précédemment que des BSR sont capables de se développer dans des milieux où les sulfates sont concentrés exclusivement au sein de la structure lamellaire de la rouille verte sulfatée, tout en étant moins disponibles pour la culture en milieu gélosé (cf. chapitre 3). De plus, la microflore se modifie certainement au sein du biofilm au cours du temps et il est possible que les populations bactériennes anaérobies se multipliant au sein du biofilm ne soient pas cultivables sur milieu gélosé.

III.1.3. Estimation de la fraction de bactéries cultivables

La fraction de bactéries cultivables est estimée en calculant le ratio du nombre de bactéries cultivables sur le nombre total de bactéries présentes dans le biofilm et est exprimée en pourcentage. Les résultats sont présentés en fonction du milieu de culture utilisé, des conditions d'oxygénation et du temps d'immersion (tableau 4.1).

La proportion de bactéries cultivables est faible par rapport à la flore bactérienne totale, même en milieu non sélectif, puisqu'elle varie entre 0,01 % sur milieu Baar pour 1 mois d'immersion et 1,76 % sur MA en anaérobiose pour 2 semaines d'immersion. Ces résultats sont en accord avec ceux reportés dans la littérature [3,10].

En aérobie, on constate que la fraction cultivable est multipliée par 12 entre 1 semaine et 1 mois avant de diminuer fortement. En anaérobiose, sur MA, le ratio triple entre 1 et 2 semaines avant de diminuer de manière drastique jusqu'à atteindre une valeur de 0,02 % après 2 mois. Concernant le milieu « Baar », les valeurs observées sont plus faibles à cause des conditions de cultures plus spécifiques avec une valeur de 0,01 % de fraction cultivable après 1 mois d'immersion. Muyser et Stams [11] ont montré que les BSR cultivables ne

dépassaient pas 1% de la microflore sulfato-réductrice totale. Ceci pourrait expliquer la faible quantité de bactéries cultivables obtenues en anaérobiose.

	Fraction de bactéries cultivables en pourcentage (%)		
	Aérobie	Anaérobie	
	MA	MA	Baar
Temps d'immersion			
1 semaine	0,03	0,46	0,11
2 semaines	0,16	1,76	0,07
1 mois	0,38	0,18	0,01
2 mois	0,14	0,02	0,02

Tableau 4.1 : Proportion de bactéries cultivables par rapport au nombre total de bactéries dans le biofilm, en fonction des conditions de culture et du temps d'immersion.

III.2. Diversité des bactéries cultivables isolées

III.2.1. Caractérisation morphologique et physiologique des bactéries cultivables

La caractérisation morphologique des bactéries cultivables a été réalisée sur l'ensemble des souches isolées à partir des cultures de la couche composite « micro-organismes / produits de corrosion ». A partir des dénombrements réalisés en milieux MA et Baar, les souches les plus représentatives (80 souches) ont été prélevées et isolées afin de les caractériser et de construire une banque de bactéries marines. Leurs caractères biochimiques de type Gram et oxydase/catalase ont été déterminés pour chacune des souches isolées en aérobiose ou en anaérobiose.

Le tableau 4.2 présenté à titre d'exemple expose les résultats concernant les souches aérobies du coupon d'une semaine.

Nom	Couleur	Dia- mètre	Aspect des colonies	Opacité	Brillance	Gram	Cata- lase	Oxy- dase	Forme des cellules	Dispo- sition
IIIA001	grisâtre	4mm	dégrade la gélose	opaque	brillante	-	+	+	bacille	isolé
IIIA002	crème	3- 7mm	concentrique/ régulière/ bombé/lisse	opaque	brillante	+	+	-	bacille	/
IIIA003	jaune pâle	3- 5mm	plate	opaque	brillante	-	-	+	bacille	isolé
IIIA004	crème	4- 6mm	bombée/bord translucide	opaque	brillante	-	-	+	bacille	isolé
IIIA005	saumon	3mm	régulière/ plate	opaque	brillante	+	+	-	bacille	amas
IIIA007	orange	1mm	bombée/ régulière/lisse	/	brillante	-	+	-	coque	isolé
IIIA008	orange	/	régulière/ bombée/lisse	/	mate	+	-	-	bacille	amas
IIIA009	blanche	6mm	irrégulière/ filamenteuse	opaque	/	+	-	-	bacille	/
IIIA010	rouge	6mm	irrégulière	opaque	brillante	+	+	-	bacille	isolé
IIIA011	blanche	/	filamenteuse/ colonie multiple/ irrégulière	/	/	+	+	-	bacille	/
IIIA012	jaune	2mm	rugueuse/ desséché	opaque	mate	-	+	-	bacille	isolé
IIIA013	Blan- châtre	2mm	régulière/lisse /bombée	transluci de	brillante	-	-	+	coccoba cille	isolé/ pair
IIIA014	blanche	/	irrégulière/ desséché	opaque	mate	-	-	-	bacille	isolé
IIIA015	jaunâtre	/	régulière/lisse sur les bords et rugueuse au centre	/	brillante	+	+	+	bacille	/
IIIA016	Trans- parente	/	concentrique/ muqueuse/ plate	transluci de	brillante	-	-	+	bacille	/
IIIA017	blanche	3- 4mm	crémeuse /bombée	opaque	brillante	+	-	+	bacille	/
IIIA018	orange foncé	/	régulière/lisse /bombée	opaque	brillante	-	-	-	bacille	/
IIIA019	jaune/ orange	/	régulière/lisse /bombée	/	brillante	-	+	-	bacille	isolé

Tableau 4.2 : Caractéristiques des souches prélevées et isolées du milieu MA en conditions aérobies, pour le coupon immergé 1 semaine. (- : négatif ; + : positif ; / indéterminé)

A partir de l'ensemble des résultats obtenus sur ces bactéries isolées, nous avons déterminé le pourcentage global de bactéries cultivables à Gram positif et à Gram négatif (tableau 4.3).

	Gram positif (%)	Gram négatif (%)
Aérobies	38	62
Anaérobies	63	37
Total	44	56

Tableau 4.3 : Proportion (%) de bactéries cultivables à Gram positif et à Gram négatif en fonction des conditions d'oxygénation.

On constate qu'en aérobiose, la majorité des souches isolées sont de type Gram négatif. Cette tendance est inversée en conditions anaérobies avec 63 % des souches de type Gram positif. En revanche, sur la totalité des souches, les bactéries à Gram négatif sont majoritaires (56% de Gram négatif pour 44 % de Gram positif).

Enfin, nous avons examiné les proportions de cellules de forme bacille et coque (tableau 4. 4).

	Bacilles (%)	Coques (%)
Aérobies	92	8
Anaérobies	84	16
Total	90	10

Tableau 4.4 : Proportion (%) des cellules de forme bacille ou coque en fonction des conditions d'oxygénation.

On observe que les bacilles sont largement majoritaires quelles que soient les conditions de culture avec 92 % en aérobiose et 84 % en anaérobiose.

III.2.2. Identification des bactéries cultivables isolées

L'ADNr16S est un gène présent chez tous les procaryotes, et très bien conservé dans l'ensemble des bactéries. C'est pourquoi il a été possible d'amplifier par PCR ce gène pour toutes les souches isolées et donc de le séquencer puis de le comparer aux séquences existantes dans les bases de données internationales (GenBank), permettant ainsi d'identifier les souches types les plus proches, selon le pourcentage d'homologie entre ces séquences. Cette caractérisation des bactéries cultivables isolées a permis de construire des arbres phylogénétiques pour chacun des temps d'immersion (toutes conditions de culture réunies). Ces arbres ont été construits à l'aide du logiciel PHYLIP-3.69 à partir d'une matrice des distances (nombre de nucléotides différents) établie entre toutes les paires de séquences auparavant alignées avec le logiciel Multalin. La robustesse de chaque arbre a été évaluée par la méthode des « bootstraps », avec 1000 rééchantillonnages au hasard d'une partie de l'alignement des séquences. On considère généralement comme fiables les branches de l'arbre pour lesquelles la valeur du bootstrap est supérieure ou égale à 95% (c'est-à-dire, dans notre cas, lorsque les branches sont retrouvées au moins 950 fois sur 1000). L'arbre a été raciné grâce à *Thermotoga*, espèce bactérienne marine supposée suffisamment éloignée de l'ensemble des autres espèces pour être utilisée comme groupe externe.

III.2.2.1. Analyse après 7 jours d'immersion

A partir du biofilm provenant du coupon immergé 1 semaine, 25 souches ont été isolées et analysées. Après comparaison avec les banques de données, l'arbre phylogénétique présenté dans la figure 4.7 a été construit.



Figure 4.7 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ARNr16S des souches cultivables issues du coupon immergé 1 semaine. Code couleur :

α-Proteobacteria	γ-Proteobacteria	δ-Proteobacteria	Actinobacteria
Bacilli	Clostridia	Flavobacteria	Fusobacteria

Les différents genres identifiés parmi les 25 souches isolées ont été rassemblés par classe (figure 4.8).

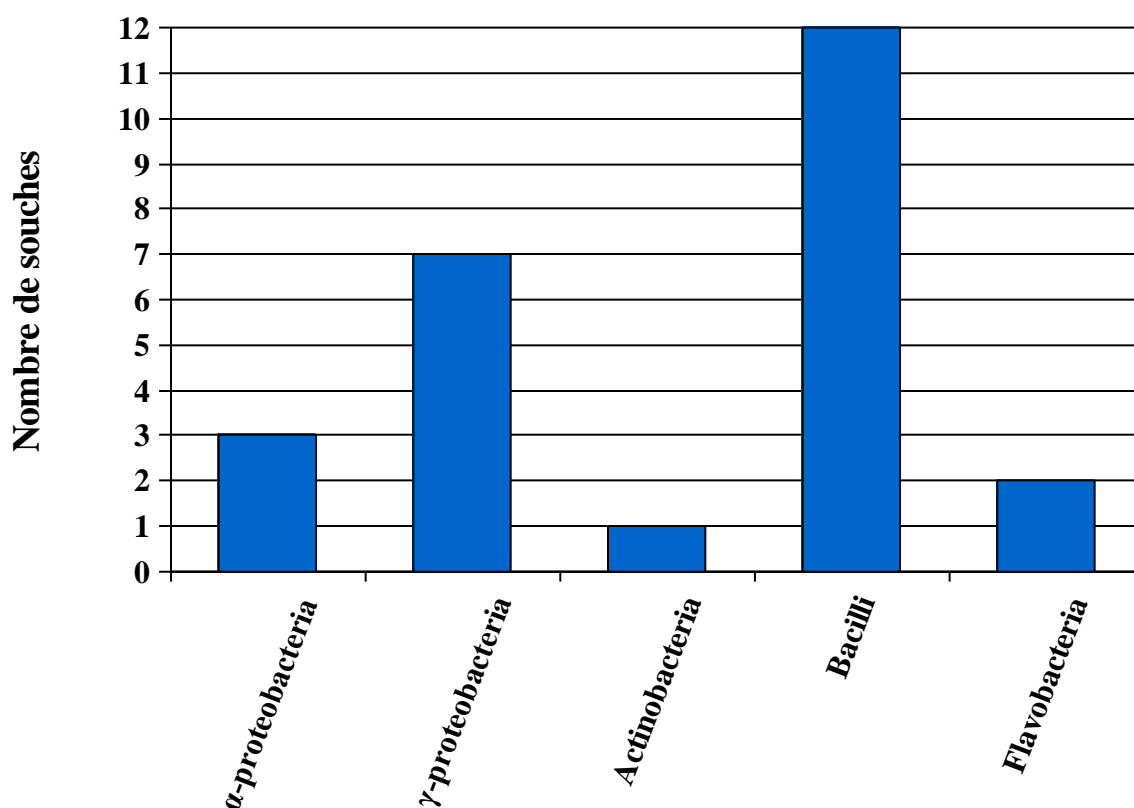


Figure 4.8 : Répartition par classe des 25 souches caractérisées issues du coupon immergé 1 semaine.

Nous constatons que près de la moitié des souches isolées sont des *Bacilli*. Viennent ensuite les *γ-Proteobacteria*, au nombre de 7, puis les *α-Proteobacteria*, *Flavobacteria* et *Actinobacteria*, toutes faiblement représentées.

III.2.2.2. Analyse après 15 jours d'immersion

L'arbre phylogénétique présenté dans la figure 4.9 a été réalisé avec les souches isolées et séquencées à partir des échantillons récoltés sur le coupon de 2 semaines.

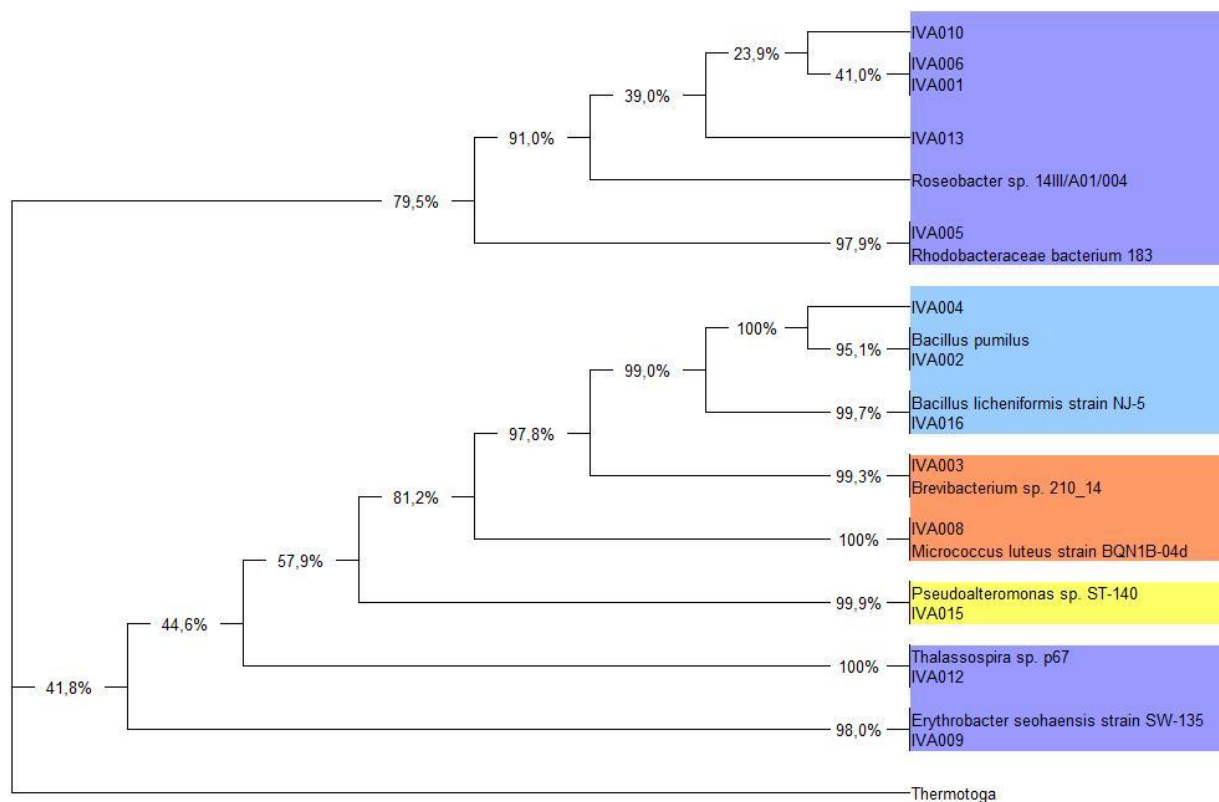


Figure 4.9 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ARNr16S des souches cultivables issues du coupon immergé 2 semaines. Code couleur :

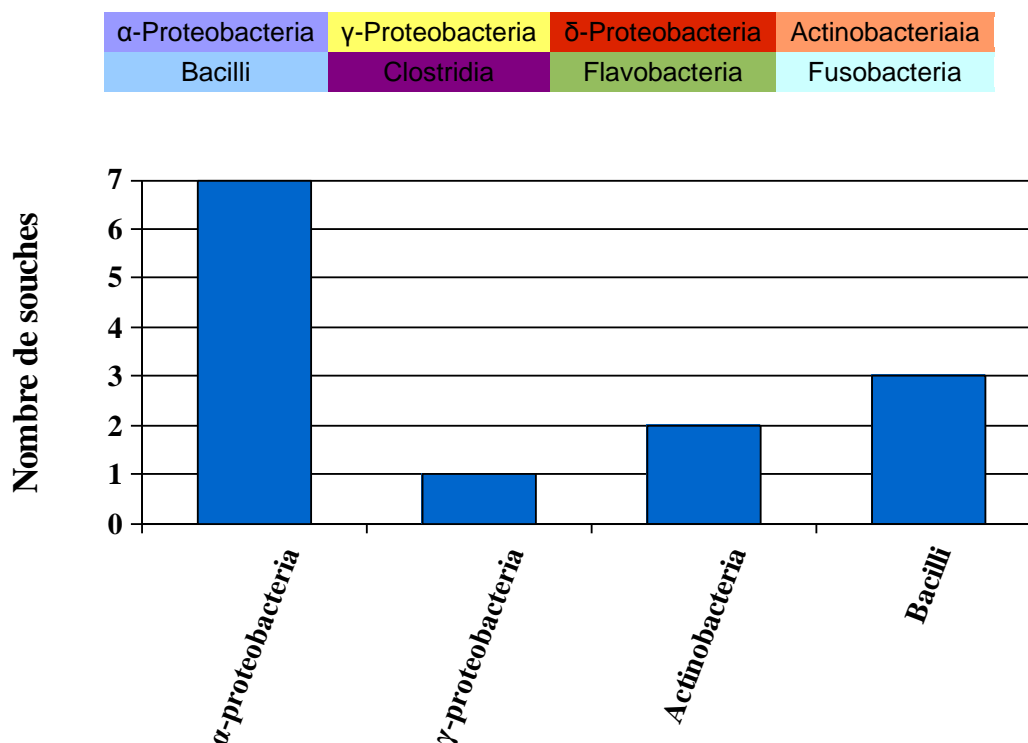


Figure 4.10 : Répartition par classe des souches caractérisées issues du coupon immergé 2 semaines.

Sur les 13 souches étudiées, on note après 2 semaines d’immersion que ce sont les α -*Proteobacteria* qui prédominent (figure 4.10). Les *Bacilli* sont 2 fois moins nombreux que les α -*Proteobacteria*. Enfin, les γ -*Proteobacteria* et *Actinobacteria* sont faiblement représentées. La classe *Flavobacteria* n’est plus présente au sein des souches cultivables sur ce coupon.

III.2.2.3. Analyse après 1 mois d’immersion

L’arbre phylogénétique présenté figure 4.11 représente la diversité bactérienne des souches cultivables récoltées après 1 mois d’immersion.

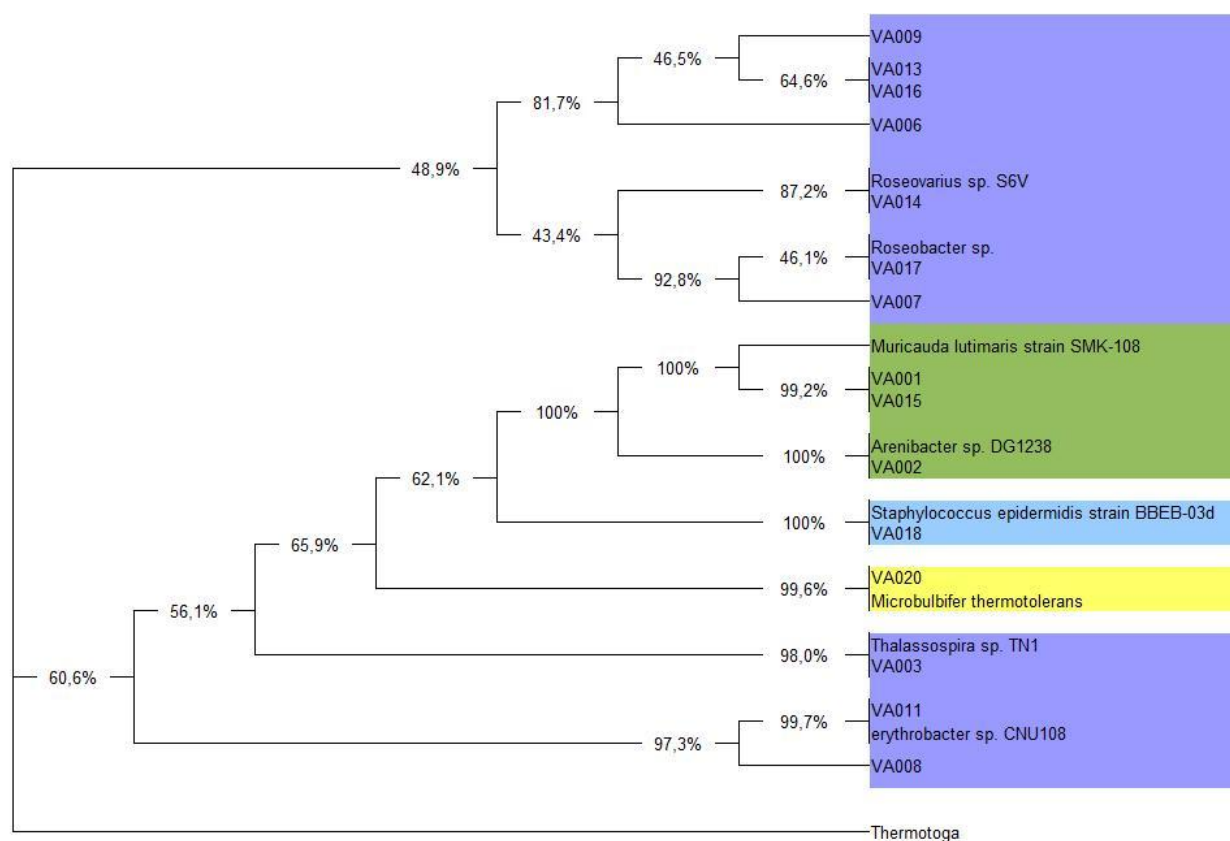


Figure 4.11 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l’ARNr16S des souches cultivables issues du coupon immergé 1 mois. Code couleur :

α -Proteobacteria	γ -Proteobacteria	δ -Proteobacteria	Actinobacteria
Bacilli	Clostridia	Flavobacteria	Fusobacteria

Ces souches ont été réparties par classe dans l'histogramme suivant (figure 4.12).

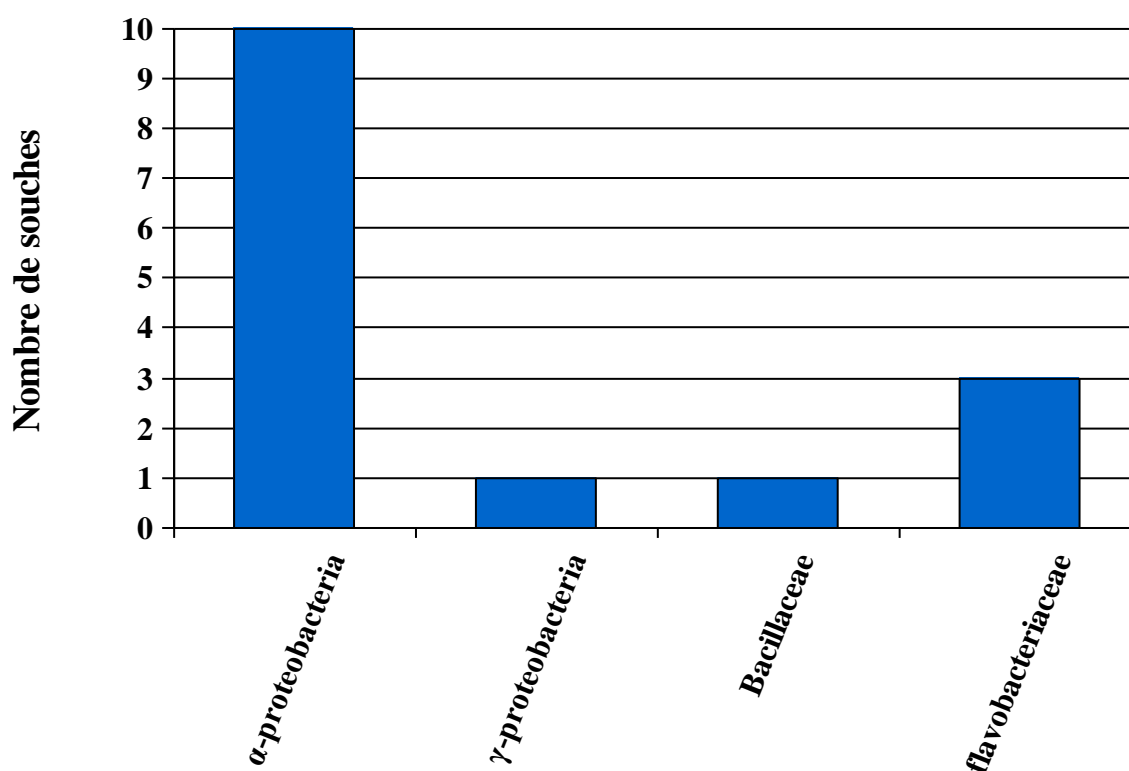


Figure 4.12 : Répartition par classe des souches caractérisées issues du coupon immergé 1 mois.

Tout comme pour le coupon immergé 2 semaines, les *α-Proteobacteria* forment la classe prépondérante parmi les 15 souches isolées. Une seule souche de *γ-Proteobacteria* et une seule souche de *Bacillaceae* ont pu être isolées tandis que la classe *Actinobacteria* disparaît par rapport aux coupons âgés d'une et deux semaines. En revanche, on peut constater la réapparition de la classe *Flavobacteria*, non observée sur le coupon de 2 semaines.

III.2.2.4. Analyse après 2 mois d'immersion

L'échantillon immergé pendant 2 mois a permis d'isoler 27 souches cultivables qui sont présentées dans l'arbre phylogénétique ci-après (figure 4.13) en fonction de leur pourcentage d'homologies.

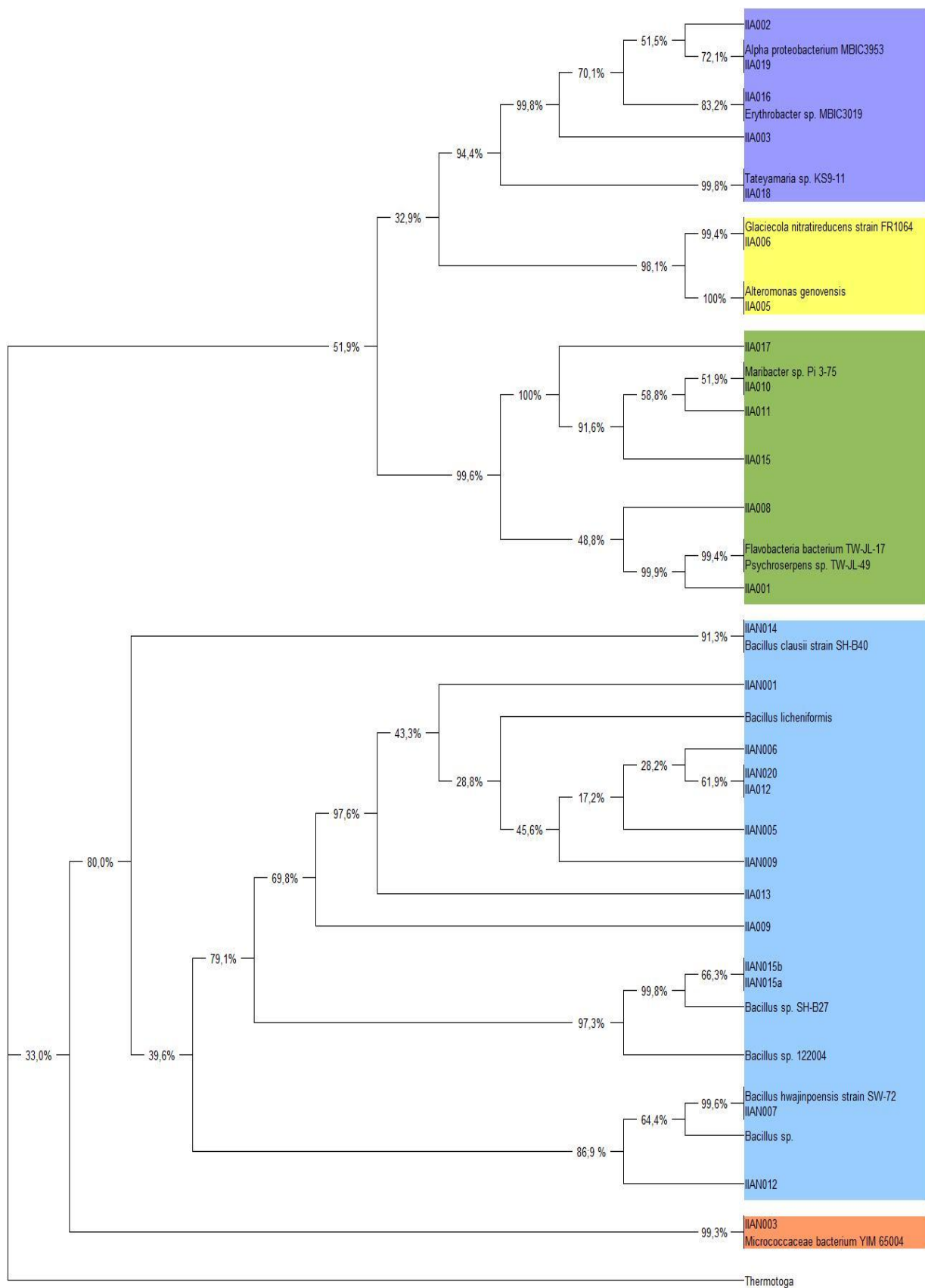


Figure 4.13 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ARNr16S des souches cultivables issues du coupon immergé 2 mois. Avec en code couleur :

α-Proteobacteria	γ-Proteobacteria	δ-Proteobacteria	Actinobacteria
Bacilli	Clostridia	Flavobacteria	Fusobacteria

Ces souches ont ensuite été réparties dans l'histogramme suivant (figure 4.14) par classe.

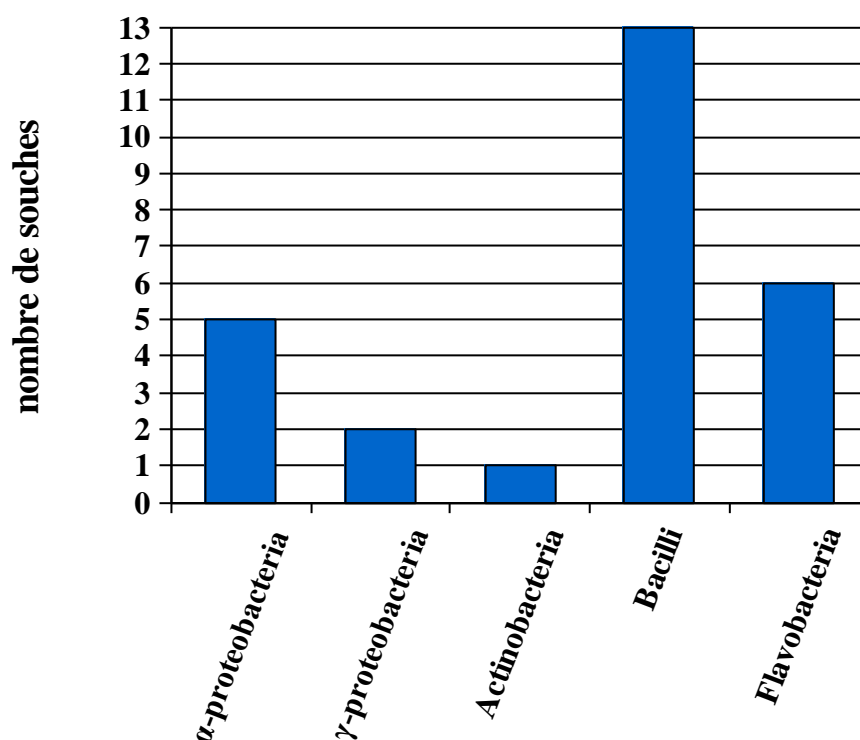


Figure 4.14 : Répartition par classe des souches caractérisées issues du coupon immergé 2 mois.

On retrouve, sur cet échantillon de 27 souches isolées, la prépondérance des *Bacilli* observée sur le coupon d'une semaine avec près de la moitié des souches isolées appartenant à cette classe. Viennent ensuite les *Flavobacteria* et les *α-Proteobacteria* et enfin les *γ-Proteobacteria* et *Actinobacteria* en faible proportion. Les proportions des différentes classes bactériennes sont assez voisines de celles observées avec le coupon immergé 1 semaine, à l'exception de celles des *Flavobacteria* et *γ-Proteobacteria* qui se sont inversées.

III.2.2.5. Conclusion

L'identification des souches cultivables isolées montre ainsi la présence de 5 classes : *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Flavobacteria*, *α-Proteobacteria*, et *γ-Proteobacteria*. Chacune de ces classes présente une large diversité de genres bactériens. Selon les stades d'immersion, la

classe des *α-Proteobacteria* (comprenant les genres *Erythrobacter* et *Roseobacter*) ou celle des *Bacilli* (comprenant majoritairement le genre *Bacillus*) est la plus largement représentée. On note également que certaines souches ont été identifiées sur une majorité de coupons. Le genre *Erythrobacter* est identifié dans tous les cas et l'espèce *Bacillus licheniformis* est identifiée à 1 semaine, 2 semaines et 2 mois d'immersion.

Les genres identifiés dans chacune des classes sont très présents en environnement marin naturel. En effet, le groupe des α -protéobactéries a été cité comme étant le groupe dominant et le plus facile à cultiver, à partir des eaux marines littorales [12], le genre *Roseobacter* représentant à lui seul plus de 25% du bactérioplancton marin [12-14]. De même, *Bacillus* fait partie des genres dominants identifiés parmi les bactéries cultivables isolées sur des échantillons similaires à ceux de notre étude [3]. *Bacillus pumilus*, notamment, est considéré comme une composante majeure des communautés bactériennes marines [15-18]. Les γ -protéobactéries sont également présentes dans beaucoup de biotopes marins, en eau libre [19] ou dans les sédiments [20,21] et font partie de la flore dominante identifiée sur des aciers immergés en eau de mer naturelle [3,22]. En environnement marin, les groupes α et γ des protéobactéries représenteraient plus de 75% des bactéries [23]. De même, la classe *Flavobacteria* est très commune dans ce milieu [21], ainsi que dans les zones d'estuaire où elle peut s'avérer dominante [24]. Par contre, le groupe des δ -protéobactéries, qui incluent la plupart des bactéries sulfurogènes (BSR principalement), n'a pas été identifié parmi les bactéries isolées jusqu'à 2 mois d'immersion.

Ces résultats d'identification par séquençage du gène de l'ARNr 16S montrent que la flore bactérienne cultivable présente une grande diversité. De plus, une telle diversité à partir d'une fraction représentant moins de 1,8% de la biomasse totale laisse supposer une diversité potentiellement élevée de l'ensemble des espèces présentes dans les biofilms composites « micro-organismes / produits de corrosion ».

Il est important de noter également la limite des méthodes d'isolement et de culture des bactéries à partir de dépôts de corrosion en milieu marin. L'utilisation de techniques de biologie moléculaire apparaît nécessaire pour avoir une meilleure estimation de la structure des communautés bactériennes au sein de ces biofilms composites.

III.3. Diversité des bactéries cultivables des enrichissements

III.3.1. Identification

Des échantillons de biofilm composite « micro-organismes / produits de corrosion »

ont été mis en culture dans du marine broth pour les conditions aérobies et du marine broth ainsi que du milieu baar modifié pour réducteurs de sulfates pour les conditions anaérobies (voir chapitre 2). La diversité bactérienne globale présente dans chacune de ces cultures (microflore cultivable enrichie) a été analysée. Après extraction de l'ADN de chacun de ces mélanges de bactéries, un fragment polymorphe du gène de l'ARNr 16S a été amplifié par PCR et analysé par TTGE. Les profils obtenus en TTGE (figure 4.15) ont permis ainsi de mettre en évidence des populations cultivables majoritaires au sein de chaque échantillon et de les comparer. Chaque bande obtenue correspond en principe à une espèce ou à un genre bactérien différent.

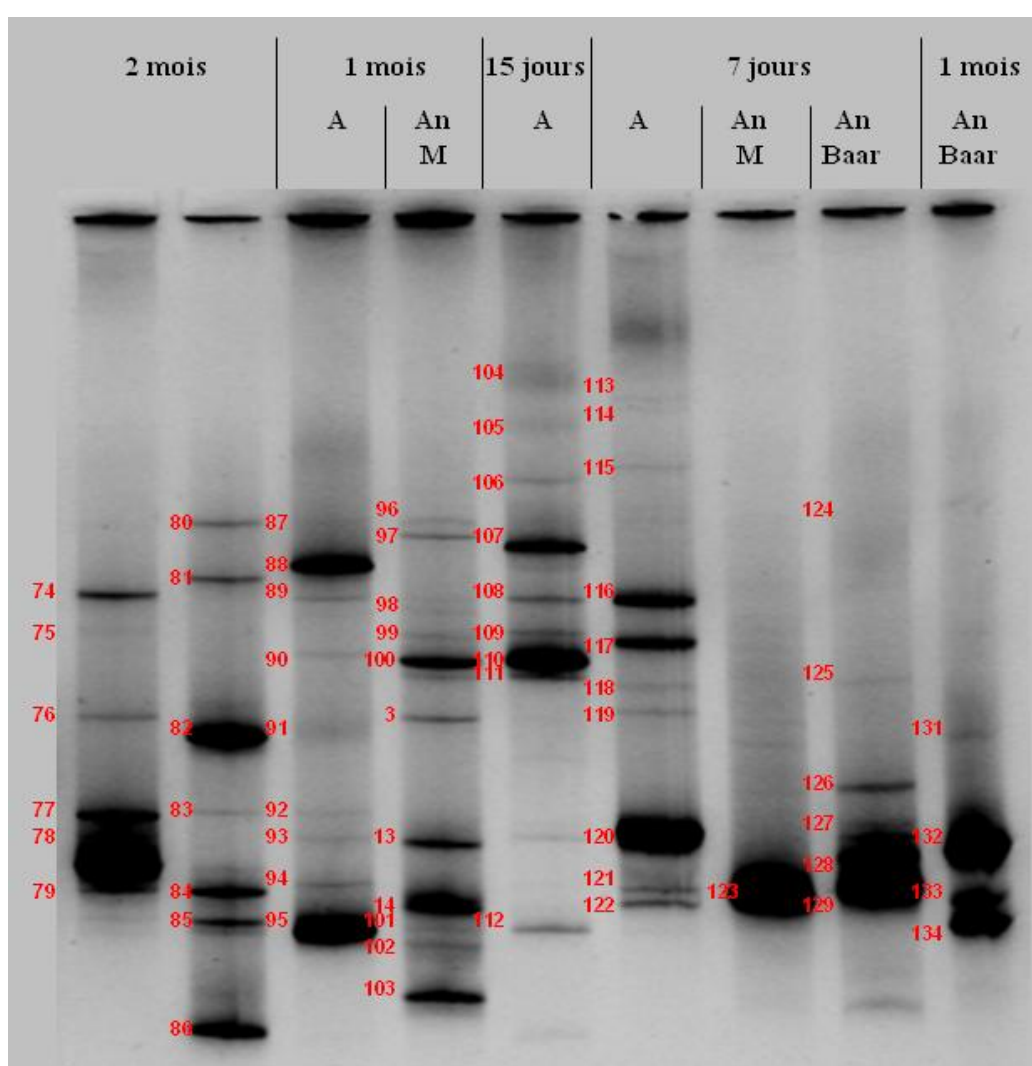


Figure 4.15 : Analyse par TTGE de la diversité bactérienne de la microflore cultivable enrichie. (A) Aérobie, (An) Anaérobie, (M) milieu Marine broth, (Baar) milieu de Baar modifié pour BSR. Les bandes numérotées ont été découpées pour être éventuellement caractérisées par séquençage de l'ADN.

Les profils observés sont, en général, très différents selon les durées d’immersion et les conditions de culture (oxygénation et milieu de culture), ce qui signifie qu’un fort polymorphisme est observé sur l’ensemble des échantillons.

L’ensemble des bandes a été découpé au scalpel et soumis à amplification par PCR. Lorsque suffisamment d’ADN a été obtenu, un séquençage a été réalisé afin d’identifier la bactérie correspondant à cette bande. Certains ADN, trop peu amplifiés, ont été clonés. Les inserts des plasmides obtenus ont alors été séquencés. Le tableau 4.2 présente les bandes qui ont été identifiées. Seule le genre ou l’espèce la plus proche est mentionné, sauf dans deux cas où nous n’avons pu trancher entre deux espèces probables.

Bande	Genre ou espèce (pourcentage d’homologie)
13	<i>Photobacterium sp. Mj214</i> (100 %)
14	<i>Desulfitisporum alkaliphilum</i> (98 %)
74	<i>Psychroserpens sp. TW-JL-49</i> (99 %)
78	<i>Pseudomonas sp. LD12</i> (99 %)
82	<i>Iron-reducing bacterium</i> enrichment culture clone HN-HFO75 (98 %)
84	<i>Marinobacter sp. JAM-G</i> (100 %)
86	<i>Clostridium aminobutyricum</i> (99 %)
88	<i>Tenacibaculum litoreum strain CL-TF13</i> (98 %)
95	<i>Vibrio sp. S693</i> (99 %)
101	<i>Jeotgalicoccus psychrophilus</i> (97 %)
110	<i>Pseudidiomarina sp. 8C</i> (100 %)
123	<i>Marinobacter sp. b110-18</i> (100 %)
128	<i>Desulfotomaculum sp. lac2</i> (100 %)
129	<i>Hydrocarbonoclasticus strain PK1</i> (99 %)
131	<i>Desulfovibrio profundus</i> (100 %) ou <i>D. dechloracetivorans</i> (100 %)
132	<i>Desulfovibrio sp.</i> (97 %)
133	<i>Vibrio ichthyenteri</i> (100 %) ou <i>V. tapetis</i> (100 %)

Tableau 4.2 : Caractérisation des bandes majoritaires (bandes numérotées de la figure 4.15) obtenues par analyse TTGE des échantillons de bactéries cultivables après enrichissement.

Parmi les genres ou espèces identifiées, seul *Psychroserpens sp. TW-JL-49* a été retrouvé dans l’analyse des souches isolées. Notons que le genre *Marinobacter* (bandes 84 et 123) désigne des organismes associés à l’oxydation du fer dans des milieux neutres (pH de 6,5 à 7,5) et suspectés de jouer un rôle dans l’oxydation des sulfures des sédiments marins via la production de Fe³⁺ [25,26]. De même, une bactérie ferri-réductrice (*Iron-reducing*

bacterium enrichment culture clone HN-HFO75, bande 82) a pu être identifiée. Ces deux bactéries associées au cycle redox du fer ont été observées sur le coupon immergé 2 mois, là où la couche de produits de corrosion est la plus importante.

D'autre part, une bactérie sulfurogène, *Desulfitisporum alkaliphilum* (bande 14), a pu être identifiée sur le coupon immergé 1 mois. Cette espèce est capable d'utiliser, en conditions anaérobies strictes et alcalines (pH de 8 à 10,3), les espèces thiosulfate, sulfite et soufre élémentaire pour produire des sulfures [27]. En outre, des BSR ont été caractérisées sur ce même coupon via la mise en culture dans un milieu favorisant leur croissance (milieu Baar). Il s'agit de *Desulfovibrio profundus* [28] ou *D. dechloracetivorans* (bande 131) [29] et *Desulfovibrio sp.* (bande 132), le genre *Desulfovibrio* étant un des genres majoritaires parmi les BSR [28]. Ces bactéries sont présentes en proportion très élevée dans l'échantillon (plus de 55% pour les bandes 128 et 132).

Cette détection de bactéries sulfurogènes et notamment de BSR concorde avec la présence de sulfures de fer identifiés localement par micro-spectroscopie Raman sur le coupon immergé 1 mois.

Enfin, une autre bactérie sulfurogène a été identifiée sur le coupon immergé 7 jours via la mise en culture dans un milieu favorisant leur croissance (Baar) : *Desulfotomaculum sp. Lac2* (bande 128) [30]. Ceci doit bien sûr nous rappeler que ces bactéries sont de toute façon déjà présentes dans le milieu marin.

III.3.2. Comparaison par densitométrie

Une analyse en densitométrie nous a permis de déterminer la représentativité relative (exprimée en pourcentage) de chaque bande par rapport au total des bandes de l'échantillon (tableaux 4.3 et 4.4).

On peut constater à l'aide de la figure 4.15 que les proportions des différentes bactéries sont très variables, que ce soit en fonction du temps d'immersion ou des conditions de culture (milieu d'enrichissement et oxygénation). Cependant, en comparant les échantillons à différents temps d'immersion enrichis sur le même milieu, on peut noter quelques similitudes.

En conditions aérobie, les bandes 116 (7 jours), 108 (15 jours), 89 (1 mois) et 74 (2 mois) semblent être identiques, et correspondraient donc à *Psychroserpens*. En revanche, leur proportion de 13 % à 7 jours diminue aux autres temps d'immersion à 5 %, 2 % et 7 % après 15 jours, 1 mois et 2 mois. Un couple de bandes apparaît à la fois à 7 et 15 jours, à savoir 116/117 à 7 jours et 108/109 à 15 jours. Les proportions associées diminuent cependant

environ de moitié en passant de 13 % (bande 116) et 11% (bande 117) à 5 % (bande 108) et 3% (bande 109).

En anaérobiose, peu de similitudes sont à observer. La seule bactérie cultivée en milieu Marine Broth après 7 jours d'immersion (bande 123), du genre *Marinobacter*, est similaire à celle retrouvée à 2 mois (bande 84) observée en plus faible proportion (12 %).

Proportion dans l'échantillon en % (numéro de la bande)			
7 jours A	7 jours An (M)	7 jours An (Baar)	15 jours A
< 2 (113)	100 (123)	< 2 (124)	5 (104)
< 2 (114)		4 (125)	< 2 (105)
< 2 (115)		10 (126)	3 (106)
13 (116)		23 (127)	24 (107)
11 (117)		62 (128-129)	5 (108)
< 2 (118)			3 (109)
< 2 (119)			46 (110)
56 (120)			7 (111)
4 (121)			7 (112)
5 (122)			

Tableau 4.3 : Proportion des bactéries cultivables après enrichissement dans les échantillons de 7 à 15 jours d'immersion (bandes numérotées de la figure 4.15). (A) Aérobie, (An) Anaérobie, (M) milieu Marine broth, (Baar) milieu de Baar modifié pour BSR.

Proportion dans l'échantillon en % (numéro de la bande)				
1 mois A	1 mois An (M)	1 mois An (Baar)	2 mois	2 mois
< 2 (87)	< 2 (96)	< 2 (131)	7 (74)	3 (80)
29 (88)	4 (97)	56 (132)	< 2 (75)	5 (81)
2 (89)	< 2 (98)	14 (133)	2 (76)	46 (82)
< 2 (90)	< 2 (99)	28 (134)	16 (77)	< 2 (83)
4 (91)	22 (100)		64 (78)	12 (84)
< 2 (92)	5 (3)		10 (79)	5 (85)
< 2 (93)	12 (13)			28 (86)
4 (94)	27 (14)			
55 (95)	< 2 (101)			
	< 2 (102)			
	22 (103)			

Tableau 4.4 : Proportion des bactéries cultivables après enrichissement dans les échantillons de 1 à 2 mois d'immersion (bandes numérotées de la figure 4.15). (A) Aérobie, (An) Anaérobie, (M) milieu Marine broth, (Baar) milieu de Baar modifié pour BSR.

III.4. Diversité de la flore bactérienne totale

III.4.1. Identification

Comme pour la microflore cultivable enrichie, la diversité de la flore bactérienne totale a été analysée par TTGE à partir des échantillons de biofilm prélevés après différentes durées d'immersion (figure 4.16) et certaines bandes ont été caractérisées par séquençage de l'ADN (tableau 4.5). On remarque que le signal obtenu pour l'échantillon de 2 mois est très faible. En effet, nous avons obtenu très peu d'ADN pour cet échantillon et n'avons donc pas pu déposer 500 ng d'ADN amplifié sur le gel. Dans ce cas, l'ADN extrait des bandes a dû être cloné pour être séquencé. Lorsque les séquences obtenues n'étaient pas analysables, les bandes ont été clonées avant d'être séquencées, comme par exemple les bandes 1 et 9.

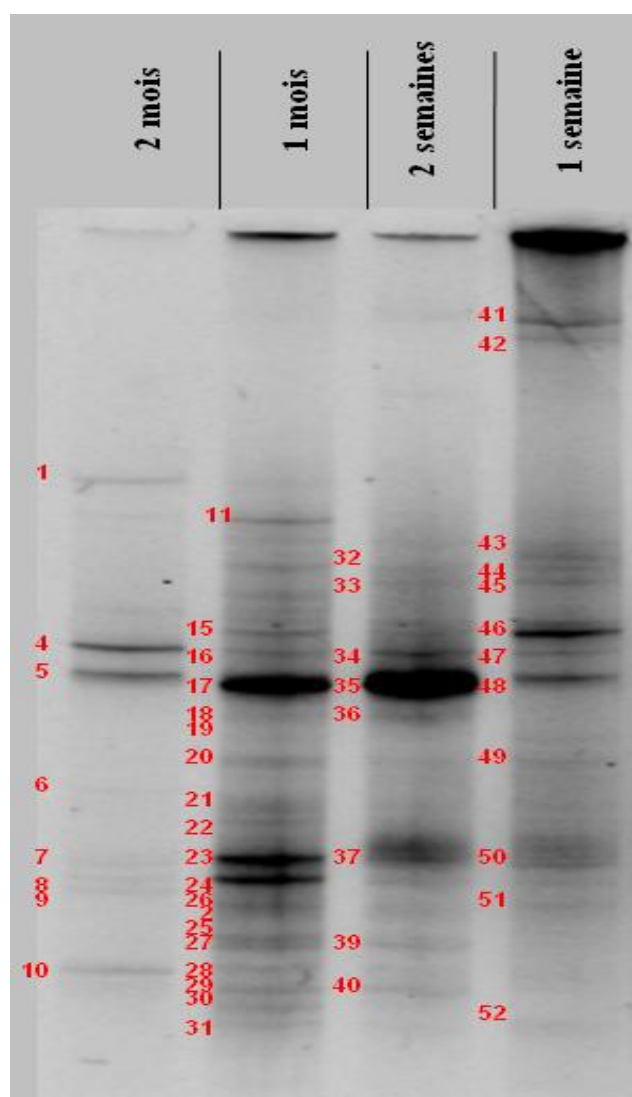


Figure 4.16 : Analyse par TTGE de la diversité de la microflore bactérienne totale.

Les bandes numérotées ont été caractérisées par séquençage de l'ADN.

Bande	Genre ou espèce (pourcentage d'homologie)
1	<i>Sulfurospirillum carboxydovorans</i> (99%) ou <i>Sulfurospirillum arcachonense F1F6</i> (98%)
9	<i>Sulfitobacter sp. KMUT7</i> (98 %) ou <i>Tateyamaria</i> (98%) ou <i>Roseobacter</i> (98 %) ou <i>Rhodobacteraceae</i> (98 %)
17	<i>Sulfurimonas autotrophica</i> (96%)
35	<i>Sulfurimonas autotrophica</i> (96%)

Tableau 4.5 : Caractérisation des bandes majoritaires (bandes numérotées de la figure 4.16) obtenues par analyse TTGE de la microflore bactérienne totale.

On peut tout d'abord noter que la diversité bactérienne varie significativement en fonction du temps d'immersion. Sur une photographie du gel plus contrastée, il est visible que le nombre de bandes et donc la diversité augmente avec le temps.

Il est intéressant de noter que l'on détecte à 15 jours et 1 mois d'immersion la présence de *Sulfurimonas autotrophica* (bandes 16, 17, 35) appartenant à la classe des ϵ -*Proteobacteria*. Ces bactéries sont associées au cycle du soufre puisque leur métabolisme aérobie, optimal à pH 6,5, leur permet d'oxyder les sulfites, les sulfures et le thiosulfate [31]. On remarque également la présence d'une bactérie proche du genre *Sulfitobacter*, issue de sédiments, au sein des clones de la bande 9. Le genre *Sulfitobacter* est également associé au cycle du soufre puisqu'il désigne des bactéries spécialisées dans l'oxydation des sulfites en sulfates [32], certaines espèces pouvant également oxyder les thiosulfates (e.g. *Sulfitobacter sp. EE-36*).

On note la présence à 2 mois d'immersion de bactéries sulfurogènes du genre *Sulfurospirillum* (1A). Il s'agit de bactéries micro-aérobie de la classe des ϵ -*Proteobacteria* qui réduisent notamment le soufre élémentaire (S^0) en sulfures [33,34]. L'espèce *Sulfurospirillum carboxydovorans* peut aussi utiliser les ions sulfites et thiosulfates, mais pas les sulfates, comme accepteurs d'électrons [34].

III.4.2. Comparaison par densitométrie

L'étude par densitométrie a permis de comparer l'intensité des bandes pour un même échantillon afin de mettre en évidence les espèces majoritaires. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.6.

On peut observer à l'aide de ces résultats que la bande 48 correspondant à une espèce fortement représentée après 7 jours d'immersion (14 %) reste présente sur les durées plus longues et devient fortement majoritaire, apparaissant via la bande 35 (57 %) à 15 jours, la bande 17 à 1 mois (36 %) et la bande 5 à 2 mois (31 %). Il s'agirait de l'espèce *Sulfurimonas autotrophica*, une BSO identifiée via les bandes 17 et 35. De même, d'après leur migration, les bandes 47, 34, 16 et 4, réparties sur les différents temps d'immersion, semblent correspondre à une même espèce. Cette espèce est minoritaire sur les temps d'immersion les plus courts avec une abondance relative de 4 % (47) à 7 jours, 10 % (34) à 15 jours et 3 % (16) à 1 mois tandis qu'elle prend de l'importance après 2 mois en représentant 30 % (4) de la masse bactérienne.

Proportion dans l'échantillon en % (numéro de la bande)			
7 jours	15 jours	1 mois	2 mois
9 (41)	4 (32)	4 (11)	8 (1)
4 (42)	4 (33)	4 (15)	30 (4)
5 (43)	10 (34)	3 (16)	31 (5)
5 (44)	57 (35)	36 (17)	6 (7)
5 (45)	5 (36)	< 2 (18-19)	6 (8)
23 (46)	17 (37)	2 (20)	6 (9)
4 (47)	2 (39)	3 (21)	13 (10)
14 (48)	2 (40)	2 (22)	
5 (49)		15 (23)	
18 (50)		12 (24)	
6 (51)		3 (26)	
< 2 (52)		< 2 (2)	
		< 2 (25)	
		< 2 (27)	
		< 2 (28)	
		2 (29)	
		< 2 (30)	

Tableau 4.6 : Proportion des espèces bactériennes de la microflore totale du biofilm de 7 jours à 2 mois d'immersion (bandes numérotées de la figure 4.16)

D'autre part, les bandes 50, 37, 23 et 7, qui semblent correspondre à une même espèce bactérienne, apparaissent en proportions voisines pour les temps d'immersion allant de 7 jours à 1 mois (15 à 18 %), tandis que la proportion diminue après 2 mois (7 %). Les espèces 41 et 42 présentes au sein de l'échantillon de 7 jours sont très excentrées en comparaison des autres

espèces et possèdent donc des rapports A-T/C-G très différents des autres espèces séparées. Elles ne sont pas observées aux autres temps d'immersion.

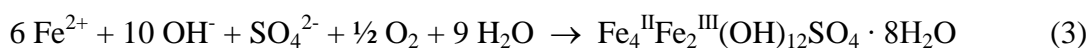
IV. Discussion

Les analyses par spectroscopie Raman réalisées sur des coupons d'acier immergés en eau de mer ont permis de déterminer la nature des produits de corrosion formés après 1 semaine à 2 mois d'exposition au milieu marin. Il s'agit de la rouille verte sulfatée et des produits de son oxydation par le dioxygène dissous, à savoir la lépidocrocite, la goethite et la magnétite. Cependant, des sulfures de fer ont pu être détectés localement sur l'échantillon immergé durant 1 mois au sein d'une couche interne de produit de corrosion.

Cette étude conforte le mécanisme de la corrosion « abiotique » d'acier en eau de mer proposé préalablement [3,4]. Ce mécanisme correspond à la première phase du modèle phénoménologique proposé par Melchers et coll. [35-39]. Dans cette phase du processus, la cinétique est contrôlée par la réaction cathodique de réduction de O₂ dissous, et donc, lorsque la couche de rouille est suffisamment épaisse, par la diffusion de O₂ au travers de cette couche. Le processus débute par la dissolution du fer et la réduction de l'oxygène dissous :



Les réactions cathodiques et anodiques ont lieu sur toute la surface. Le premier solide formé semble être la rouille verte sulfatée. Il est probable que l'oxygène dissous oxyde très rapidement une partie du Fe(II) permettant la précipitation directe de la rouille verte sulfatée à partir des espèces en solution. Il a été par ailleurs démontré qu'une telle réaction était en effet possible [40]. Dans cette hypothèse, la seconde étape est la formation de la rouille verte, qui s'écrit comme suit :



Enfin, la rouille verte formée est rapidement oxydée en lépidocrocite (γ -FeOOH), goethite (α -FeOOH), ou magnétite en fonction de différents paramètres et notamment du flux d'oxygène, de la température et de la concentration en Fe(II) dissous [5,41-44] :



La lépidocrocite s'avère être le principal produit de l'oxydation de la rouille verte sulfatée, notamment pour les plus courtes durées d'exposition (cf. figure 4.1 relative à l'exposition d'une semaine). Sa formation est en effet favorisée par de grands flux d'oxygène et des températures modérées ($T \leq 20^\circ\text{C}$) [5,41-44].

En parallèle, un biofilm microbien se développe et la couche de rouille se recouvre d'un film de substances organiques (comprenant notamment des micro-organismes) ainsi que de substances minérales issues de l'eau de mer. La diffusion de l'oxygène dissous dans l'eau de mer jusqu'à la surface du métal est donc limitée. De plus, l'activité biologique au sein du biofilm et dans la partie externe des produits de corrosion peut consommer une forte proportion de cet oxygène, ce qui conduit à des conditions d'anaérobiose dans la partie interne de la couche de rouille. Ce micro-environnement limite l'oxydation de la rouille verte sulfatée et mène donc à l'accumulation de ce produit en surface du coupon. D'autre part, l'oxydation de la rouille verte en composés autres que la lépidocrocite se trouve favorisée. La magnétite est le produit caractéristique d'une transformation de la rouille verte dans des conditions de faible oxygénation [5,42]. De même, la goethite est favorisée par rapport à la lépidocrocite quand la cinétique d'oxydation de la rouille verte est ralentie, notamment par une diminution du flux d'oxygène [5,41]. Les observations effectuées montrent une proportion plus grande de magnétite après 15 jours d'immersion qu'après 7 jours. De même, la goethite n'est détectée qu'à partir de 15 jours d'immersion et devient de plus en plus présente après 1 et 2 mois d'immersion.

Par la suite, la couche de produits de corrosion devenant de plus en plus épaisse, les zones internes se retrouvent dans des conditions anoxiques favorables au développement de bactéries sulfurogènes et notamment de BSR. A partir de là, la concentration en espèces sulfures augmente à proximité de la surface du métal, conduisant à la précipitation de mackinawite nanocristalline. Au pH de l'eau de mer, l'espèce HS^- prédomine et la réaction s'écrit alors :



Le processus de corrosion change donc : il est maintenant influencé par les BSR.

Cependant, après 1 à 2 mois d'immersion, la présence de FeS reste marginale. Sur les coupons correspondants, nous n'avons détecté qu'une seule fois, très localement, la mackinawite nanocristalline. Ceci indique que ces durées d'exposition sont encore insuffisantes pour que les conditions propices à la colonisation de la couche de rouille par une microflore anaérobie spécifique aient été réunies. En particulier, une épaisseur minimale doit être atteinte avant que la quasi-totalité de l'oxygène dissous en provenance du milieu soit

intégralement consommée par les micro-organismes aérobies et par l'oxydation de la rouille verte sulfatée.

L'analyse microbiologique a confirmé la grande diversité d'espèces bactériennes de la microflore associée aux biofilms composites « micro-organismes / produits de corrosion » formés en environnement portuaire, déjà mise en évidence par S. Pineau [3].

Les différents résultats obtenus semblent indiquer que les bactéries associées aux cycles du fer et du soufre sont favorisées par le développement de la couche de produits de corrosion. En particulier, l'échantillon immergé 1 mois, après enrichissement de la microflore bactérienne cultivable, a permis d'identifier la présence de BSR du genre *Desulfovibrio*, dont les espèces *Desulfovibrio profundus* ou *D. dechloracetivorans*. Ce résultat est à mettre en parallèle avec l'observation de FeS grâce à la μ -spectroscopie Raman. Néanmoins, alors que *Desulfovibrio* est majoritaire dans cet enrichissement, nous n'avons pas réussi à isoler cette microflore directement à partir du biofilm composite récolté sur les coupons immergés pendant 1 mois. En effet, ces bactéries sont difficiles à cultiver en culture pure [11] et il est possible qu'un consortium bactérien présent dans l'enrichissement, impliquant des relations symbiotiques entre les différentes espèces bactériennes, favorise leur croissance. Cependant, les BSR n'ont pas pu être observées dans les enrichissements à deux mois d'immersion. Ceci laisse à penser que certaines conditions ont permis aux BSR de coloniser une zone bien particulière du coupon immergé un mois. Il s'agit probablement de la zone où des sulfures de fer ont été identifiés localement. Dans cette zone particulière, des conditions anaérobies ont dû s'établir précocement au sein de la couche composite biofilm / produits de corrosion, que l'on sait très hétérogène par nature.

D'autres micro-organismes associés au soufre ou au fer ont été identifiés sur les coupons immergés pendant un ou deux mois. Il s'agit notamment de bactéries micro-aérobies sulfurogènes du genre *Sulfurospirillum* ou de l'espèce *Desulfitispora alkaliphilum*, micro-organismes pouvant utiliser le soufre élémentaire, les thiosulfates et les sulfites, mais pas les sulfates, comme accepteurs d'électrons. D'autre part, des micro-organismes du genre *Sulfitobacter* ou *Sulfurimonas*, susceptibles d'oxyder les sulfites et parfois les thiosulfates, et du genre *Marinobacter*, susceptibles d'oxyder Fe(II) en Fe(III), ont été identifiés. De même, une espèce ferri-réductrice a pu être mise en évidence sur le coupon immergé deux mois.

En comparant la composition des microflores bactériennes cultivable et totale, nous pouvons observer que les bactéries isolées directement des biofilms composites ne sont pas

retrouvées parmi la microflore bactérienne totale. De plus, les profils obtenus par TTGE de la microflore bactérienne totale et de la microflore cultivable enrichie sont très différents quelles que soient les durées d'immersion, ce qui signifie que les bactéries cultivables majoritaires ne sont pas en général les bactéries majoritaires du biofilm. Ces différences semblent traduire la diversité des micro-organismes susceptibles de se développer à la surface de l'acier plutôt qu'une évolution de la flore sous l'effet de la modification de l'interface métal/milieu. Ceci est à relier aux analyses physico-chimiques, qui indiquent que l'influence des BSR reste marginale jusqu'à deux mois d'immersion. Compte tenu des particularités physico-chimiques des dépôts de corrosion, composés en grande partie d'oxydes de fer et concentrant beaucoup d'éléments métalliques, nous aurions pu penser que ces dépôts constituaient un environnement peu propice au développement des micro-organismes marins. Néanmoins, il avait déjà été démontré que les micro-organismes ont tendance à se fixer dans les dépôts de corrosion [45,46]. Pineau [3] a émis l'hypothèse d'une mixité des communautés bactériennes (composées de nombreuses populations) au sein des dépôts de corrosion sur acier en environnement portuaire, plutôt que l'existence d'une stratification des populations (composées d'une même espèce). Ceci sous-entend la formation de micro-niches écologiques permettant le développement d'un grand nombre de groupes métaboliques. La présence de micro-niches au sein de biofilms aérobies, permettant la survie de micro-organismes anaérobies, tels que les bactéries sulfato-réductrices, a déjà été décrite [47-50]. De plus, cette mixité favoriserait les symbioses entre espèces bactériennes.

L'analyse de la fraction cultivable et de la microflore bactérienne totale ne permet pas d'établir de conclusion quant à une diversité spécifique différente entre les couches de produits de corrosion. Nous pouvons nous attendre néanmoins à ce que la couche de surface du biofilm composite soit plus riche en diversité bactérienne puisque l'environnement marin extérieur est plus propice au développement des micro-organismes que la surface métallique [3]. Ceci sera confirmé par les travaux présentés dans le chapitre 5.

Par comparaison avec les résultats antérieurs [3,4], il semble donc que le système de corrosion bascule du processus « abiotique » (réactions 2 et 3) au processus influencé par les BSR (réaction 4) entre le 2^{ème} et le 6^{ème} mois d'immersion. Néanmoins, selon Melchers et Jeffrey [37], la transition entre la première phase, aérobie, et la seconde phase, anaérobie, du processus a lieu au bout d'un temps t_a qui dépend notamment de la température de l'eau. Dans ce modèle, t_a vaut 6-12 mois pour des températures de 20 à 30°C et peut aller jusqu'à 3 ans

pour des températures de 10 à 15°C. Cette période de transition devra être tout particulièrement étudiée dans des travaux futurs. L'évolution des zones très locales où se développent des bactéries sulfurogènes, telle que celle observée sur le coupon immergé un mois via la présence de FeS, devrait notamment fournir des informations sur la genèse des cas de dégradation accélérée imputés aux bactéries sulfurogènes.

Rappelons pour conclure l'abondance, observée après 1 à 2 mois d'immersion, des bactéries associées aux cycles du fer et du soufre, conséquence de l'environnement particulier que constitue la couche de rouille. Ceci montre que même si le processus de corrosion n'est pas encore clairement influencé par les bactéries, les conditions propices à cette influence sont déjà établies.

Références :

- [1] R. Sabot, M. Jeannin, M. Gadouleau, Q. Guo, E. Sicre, Ph. Refait, *Influence of lactate ions on the formation of rust*, Corros. Sci. **49** (2007) p. 1610-1624.
- [2] Ph. Refait, P. Girault, M. Jeannin, J. Rose, *Influence of arsenate species on the formation of Fe(III) oxyhydroxides from Fe(II)*, Colloids Surf. A, **332** (2009) p. 26-35.
- [3] S. Pineau, Thèse, Université de Technologie de Compiègne (2006).
- [4] S. Pineau, R. Sabot, L. Quillet, M. Jeannin, Ch. Caplat, I. Dupont-Morral, Ph. Refait, *Formation of the Fe(II-III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel associated to molecular detection of dissimilatory sulphite-reductase*, Corros. Sci. **50** (2008) p. 1099-1111.
- [5] F. Gilbert, Ph. Refait, F. Lévêque, C. Remazeilles, E. Conforto, *Synthesis of goethite from Fe(OH)₂ precipitates: influence of Fe(II) concentration and stirring speed*, J. Phys. Chem. Solids, **69** (2008) p. 2124-2130.
- [6] J.A. Bourdoiseau, M. Jeannin, R. Sabot, C. Rémazeilles, Ph. Refait, *Characterisation of mackinawite by Raman spectroscopy: effects of crystallisation, drying and oxidation*, Corros. Sci. **50** (2008) p. 3247-3255.
- [7] H. Ohfuji, D. Rickard, *High resolution transmission electron microscopic study of synthetic nanocrystalline mackinawite*, Earth and Planetary Science Letters **241** (2006) p. 227-233.

- [8] H.Y. Jeong, J.H. Lee, K.F. Hayes, *Characterization of nanocrystalline mackinawite: Crystal structure, particle size, and specific surface area*, Geochim. Cosmochim. Acta **72** (2008) p. 493-505.
- [9] Ph. Refait, J.-B. Memet, C. Bon, R. Sabot, J.-M. R. Génin, *Formation of the Fe(II)-Fe(III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel*, Corros. Sci. **45** (2003) p. 833-845.
- [10] P. Lebaron, P. Servais, M. Trousselier, C. Courties, G. Muyzer, L. Bernard, H. Schäfer, R. Pukall, E. Stackebrandt, T. Guindulain, J. Vives-Rego, *Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms : changes in abundances, activity and composition*, FEMS microbiology ecology (2001) p. 255-266.
- [11] G. Muyzer, A.J. Stams, *The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria*, Nat. Rev. Microbiol. **6** (2008) p. 441-454.
- [12] J.M. Gonzalez, M.A. Moran, *Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater*, Appl. Environ. Microbiol. **63** (1997) p. 4237-4242.
- [13] J. Pernthaler, R. Amann, *Automated Enumeration of Groups of Marine Picoplankton after Fluorescence In Situ Hybridization*, Microbiol. Mol. Biol. Rev. **69** (2005) p. 440-461.
- [14] M.T. Suzuki, C.M. Preston, F.P. Chavez, E.F. Delong, *Quantitative mapping of bacterioplankton populations in seawater: field tests across an upwelling plume in the Monterey Bay*, Aqua. Microbial Ecol. **24** (2001) p. 117-127
- [15] H. Boeye, M. Aerts, *Numerical taxonomy of Bacillus isolates from North Sea sediments*, Int. J. Syst. Bacteriol. **26** (1976) p. 427-441.
- [16] E.P. Ivanova, M.V. Vysotskii, V.I. Svetashev, O.I. Nedashkovskaya, N.M. Gorshkova, V.V. Mikhailov, N. Yumoto, Y. Shigeri, T. Taguchi, S. Yoshikawa, *Characterisation of Bacillus strains of marine origin*, Int. Microbiol. **2** (199) p. 267-271.
- [17] M. Ortigosa, E. Garay, M.-J. Pujalte, *Gram-positive bacteria of marine origin: a numerical taxonomic study on Mediterranean isolates*, Microbiologia **13** (1997) p.453-462.
- [18] H.J. Ruger, *Benthic studies of the northwest African upwelling region psychrophilic bacterial communities from areas with different upwelling intensities*, Mar. Ecol. Prog. Ser. **57** (1989) p. 45-52.
- [19] J.C. Cho, S.J. Giovannoni, *High-Throughput Methods for Culturing Microorganisms in Very-Low-Nutrient Media Yield Diverse New Marine Isolates*, Appl. Environ. Microbiol. **70** (2004) p. 432-440.

- [20] J.P. Gray, R.P. Herwig, *Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments*, Appl. Environ. Microbiol., **62** (1996) p. 4049-4059
- [21] K. Ravenschlag, K. Sahm, R. Amann, *Quantitative Molecular Analysis of the Microbial Community in Marine Arctic Sediments (Svalbard)*, Appl. Environ. Microbiol. **67** (2001) p. 387-395.
- [22] D. Bermont-Bouis, M. Janvier, P.A.D. Grimont, I. Dupont, T. Vallaey, *J. Appl. Microbiol.* **102** (2007) p. 161-168.
- [23] P. Hugenholtz, B.M. Goebel, N.R. Pace, *Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity*, J. Bacteriol. **180** (1998) p. 4765-4774
- [24] V. Kisand, R. Cuadros, J. Wikner, *Combining Culture-Dependent and -Independent Methodologies for Estimation of Richness of Estuarine Bacterioplankton Consuming Riverine Dissolved Organic Matter*, Appl. Environ. Microbiol. **68** (2002) p. 379-388
- [25] Y. Rodriguez, A. Balleste, M.L. Blazquez, F. Gonzalez, J.A. Munoz, *New information on the chalcopyrite bioleaching mechanism at low and high temperature*, Hydrometallurgy **71** (2003) p. 47–56.
- [26] M. Müller, K.M. Handley, J. Lloyd, R.D. Pancost, R.A. Mills, *Biogeochemical controls on microbial diversity in seafloor sulphidic sediments*, Geobiology **8** (2010) p. 309–326.
- [27] D.Y. Sorokin, G. Muyzer, *Haloalkaliphilic spore-forming sulfidogens from soda lake sediments and description of Desulfitispora alkaliphila gen. nov., sp. nov.* Extremophiles **14** (2010) p. 313-320.
- [28] N. Boudaud, M. Coton, E. Coton, S. Pineau, J. Travert, C. Amiel, *Biodiversity analysis by polyphasic study of marine bacteria associated with biocorrosion phenomena*, J. Appl. Microbiol. **109** (2010) p. 166-179.
- [29] B. Sun, J.R. Cole, R.A. Sanford, J.M. Tiedje, *Isolation and Characterization of Desulfovibrio dechloracetivorans sp. nov., a Marine Dechlorinating Bacterium Growing by Coupling the Oxidation of Acetate to the Reductive Dechlorination of 2-Chlorophenol*, Applied and Environmental Microbiology, **66** (2000) p. 2408-2413.
- [30] K.U. Kjeldsen, A. Loy, T.F. Jacobsen, T.R. Thomsen, M. Wagner, K. Ingvorsen, *Diversity of sulfate-reducing bacteria from an extreme hypersaline sediment, Great Salt Lake (Utah)*, FEMS Microbiol. Ecol. **60** (2007) p. 287-298.
- [31] F. Inagaki, K. Takai, H. Kobayashi, K. H. Nealson and K. Horikoshi, *Sulfurimonas autotrophica gen. nov., sp. nov., a novel sulfur-oxidizing e-proteobacterium isolated from hydrothermal sediments in the Mid-Okinawa Trough*, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **53** (2003) p. 1801–1805.

- [32] E.P. Ivanova, N.M. Gorshkova, T. Sawabe, N.V. Zhukova, K. Hayashi, V.V. Kurilenko, Y. Alexeeva, V. Buljan, D.V. Nicolau, V.V. Mikhailov, R. Christen, *Sulfitobacter delicatus* sp. nov. and *Sulfitobacter dubius* sp. nov., respectively from a starfish (*Stellaster equestris*) and sea grass (*Zostera marina*), Int. J. System. Evol. Microbiol. **54** (2004) p. 475-480.
- [33] K. Finster, W. Liesack, B.J. Tindall, *Sulfurospirillum arcachonense* sp. nov., a new-microaerophilic sulfur-reducing bacterium, Int. J. Syst. Bacteriol. **47** (1997) p. 1212–1217.
- [34] A. Jensen, K. Finster, *Isolation and characterization of Sulfurospirillum carboxydovorans* sp. nov., a new microaerophilic carbon monoxide oxidizing epsilon *Proteobacterium*, Antonie van Leeuwenhoek **87** (2005) p. 339–353.
- [35] R. E. Melchers, *Modelling of marine immersion corrosion for mild and low alloy steels – Part 1: Phenomenological model*, Corrosion (NACE) **59** (2003) p. 319-334.
- [36] R.E. Melchers, *Mathematical modelling of the diffusion controlled phase in marine immersion corrosion of mild steel*, Corros. Sci. **45** (2003) p. 923-940.
- [37] R. E. Melchers, R. Jeffrey, *Early corrosion of mild steel in seawater*, Corros. Sci. **47** (2005) p. 1678-1693.
- [38] R. E. Melchers, T. Wells, *Models for the anaerobic phases of marine immersion corrosion*, Corros. Sci. **48** (2006) p. 1791-1811.
- [39] R. Jeffrey, R. E. Melchers, *The changing topography of corroding mild steel surfaces in seawater*, Corros. Sci. **49** (2007) p. 2270-2288.
- [40] Ph. Refait, A. Géhin, M. Abdelmoula, J.-M. R. Génin, *Coprecipitation thermodynamics of iron(II-III) hydroxysulphate green rust from Fe(II) and Fe(III) salts*, Corros. Sci. **45** (2003) p. 656-676.
- [41] J. Detournay, M. Ghodsi, R. Derie, *Etude cinétique de la formation de goethite par aération de gels d'hydroxyde ferreux*, Ind. Chim. Belg. **39** (1974) p. 695-701.
- [42] A. A. Olowe, B. Pauron, J.-M. R. Génin, *The influence of temperature on the oxidation of ferrous hydroxide in sulphated aqueous medium: activation energies of formation of the products and hyperfine structure of magnetite*, Corros. Sci. **32** (1991) p. 985-1001.
- [43] A. A. Olowe, J.M.R. Génin, *The mechanism of oxidation of Fe(II) hydroxide in sulphated aqueous media : importance of the initial ratio of the reactants*, Corros. Sci. **32** (1991) p. 965-984.
- [44] A. A. Olowe, J.-M. R. Génin, *The influence of concentration on the oxidation of ferrous hydroxide in acidic sulphated aqueous medium: particle size analysis of lepidocrocite*, Corros. Sci. **32** (1991) p. 1021-1028.

- [45] F.G. Ferris, T.R. Jack, B.J. Bramhill, *Corrosion products associated with attached bacteria at an oil field water injection plant*, Can. J. Microbiol. **38** (1992) p. 1320-1324
- [46] B.J. Little, P.A. Wagner, K.R. Hart, R.I. Ray, *Spatial relationship between bacteria and localised corrosion*, Corrosion 96 (1996) paper n° 278, Houston TX, NACE.
- [47] W.A. Hamilton, *Sulphate-Reducing Bacteria and Anaerobic Corrosion*, Ann. Rev. Microbiol. **39** (1985) p. 195-217.
- [48] W.A. Hamilton, Biofilms and microbially influenced corrosion on Microbial Biofilms, Vol.5, *Lappin-Scott and Costerton* (Eds.), (1995).
- [49] W. Lee, Z. Lewandowski, P.H. Nielsen, W.A. Hamilton, *Role of sulphate-reducing bacteria in corrosion of mild steel: a review*, Biofouling **8** (1995) p. 165-194.
- [50] W. Lee, W.G. Characklis, *Corrosion of mild steel under anaerobic biofilm*, Corrosion **49** (1993) p. 186-198.

Chapitre 5 : Mécanismes de la corrosion marine des aciers en période anoxique

Dans cette seconde partie de l'étude du système constitué par l'acier, la couche composite « rouille/micro-organismes » et le milieu marin, nous nous sommes attachés à comprendre les mécanismes associés à la période anoxique. Comme expliqué au chapitre précédent, la surface de l'acier, après une durée d'immersion plus ou moins longue, est placée en conditions anoxiques, c'est-à-dire que l'oxygène dissous dans l'eau de mer ne parvient plus à franchir la couche composite « rouille/micro-organismes ». Cette couche poreuse ne joue pas ici le rôle d'une barrière physique. L'oxygène est intégralement consommé dans les parties externes de la couche par les micro-organismes aérobies, d'une part, et par les réactions d'oxydation de Fe(II) en Fe(III), d'autre part. On peut considérer que le début de cette période anoxique correspond au moment où la surface de l'acier est intégralement recouverte de sulfures de fer FeS. Cet événement indique en effet que l'ensemble de la surface est colonisée par les micro-organismes anaérobies que sont les BSR et autres bactéries sulfurogènes. Différents paramètres influent sur la durée au bout de laquelle le système atteindra ce stade de développement, mais on peut estimer qu'elle varie entre 6 mois et 3 ans [1-4]. Le modèle phénoménologique proposé par R.E. Melchers [3-6] suppose que la cinétique de corrosion soit contrôlée par la réduction de O₂ dissous en période aérée et par le transport des nutriments nécessaires aux BSR en période anoxique.

Différentes questions relatives au comportement de l'acier en conditions anoxiques demeurent sans réponse. La première est relative à la formation de la rouille verte sulfatée RV(SO₄²⁻). Il est maintenant clairement établi, comme démontré au chapitre 4, que ce produit de corrosion est caractéristique de la période aérée et résulte du processus « abiotique » qui gouverne la cinétique des premiers stades de la corrosion marine des aciers. Il n'est par contre pas évident que ce produit puisse continuer à se former en période anoxique. L'accumulation de FeS à la surface de l'acier au début de cette période laisse d'ailleurs penser que ce n'est effectivement pas le cas. Néanmoins, différents travaux effectués dans des solutions carbonatées ont montré que l'hydroxycarbonate à valence mixte Fe(II,III), analogue carbonaté de RV(SO₄²⁻), pouvait se former en l'absence d'oxygène [7-9]. Nous avons donc entrepris dans un premier temps d'étudier le comportement d'électrodes d'acier en conditions anoxiques dans des électrolytes similaires à l'eau de mer. Les résultats sont présentés dans la

première partie de ce chapitre. Ils ont fait l'objet d'une publication parue dans la revue *Electrochimica Acta* [10].

Nous avons ensuite, avec la méthodologie déjà employée au chapitre 4, caractérisé la couche composite « rouille/micro-organismes » formée sur un coupon d'acier E24 après 11 ans d'immersion permanente dans l'eau du port des Minimes de La Rochelle. Les résultats, décrits dans la partie II de ce chapitre, seront confrontés à ceux obtenus en eau de mer synthétique.

I. Polarisation anodique d'électrodes d'acier en milieux désaérés

La procédure expérimentale utilisée est décrite dans le chapitre 2, section II.5 « Synthèse de couches de rouille modèle ». Rappelons que nous avons choisi pour simplifier de travailler avec des électrolytes constitués uniquement de sels de sodium. Pour l'électrolyte que nous appellerons « eau de mer simplifiée », nous avons considéré des concentrations voisines de celles caractéristiques de l'eau de mer. Les rapports des concentrations $[\text{Cl}^-]/[\text{SO}_4^{2-}]$ (= 16,6) et $[\text{SO}_4^{2-}]/[\text{HCO}_3^-]$ (= 10) sont en particulier du même ordre de grandeur que ceux de l'eau de mer (19 et 12 selon [11]). Le pH de cet électrolyte, de valeur moyenne 7,95, s'apparente également à celui de l'eau de mer. Enfin, pour étudier le rôle de la concentration en carbonate et du rapport $[\text{SO}_4^{2-}]/[\text{HCO}_3^-]$, trois électrolytes constitués à partir des sels Na_2SO_4 et NaHCO_3 ont été utilisés.

I.1. Polarisation anodique dans l'eau de mer simplifiée désaérée

Le potentiel d'abandon de l'électrode d'acier a été mesuré pendant 30 minutes avant chaque expérience de voltamétrie ou de chronampérométrie. Il varie légèrement autour de -0,75 V/ECS.

Dans un premier temps, une étude en voltamétrie linéaire a été effectuée. La figure 5.1 présente une courbe de polarisation typique. Elle a été obtenue dans un électrolyte désaéré maintenu sous un flux d'argon dont les bulles provoquent une agitation permanente du liquide.

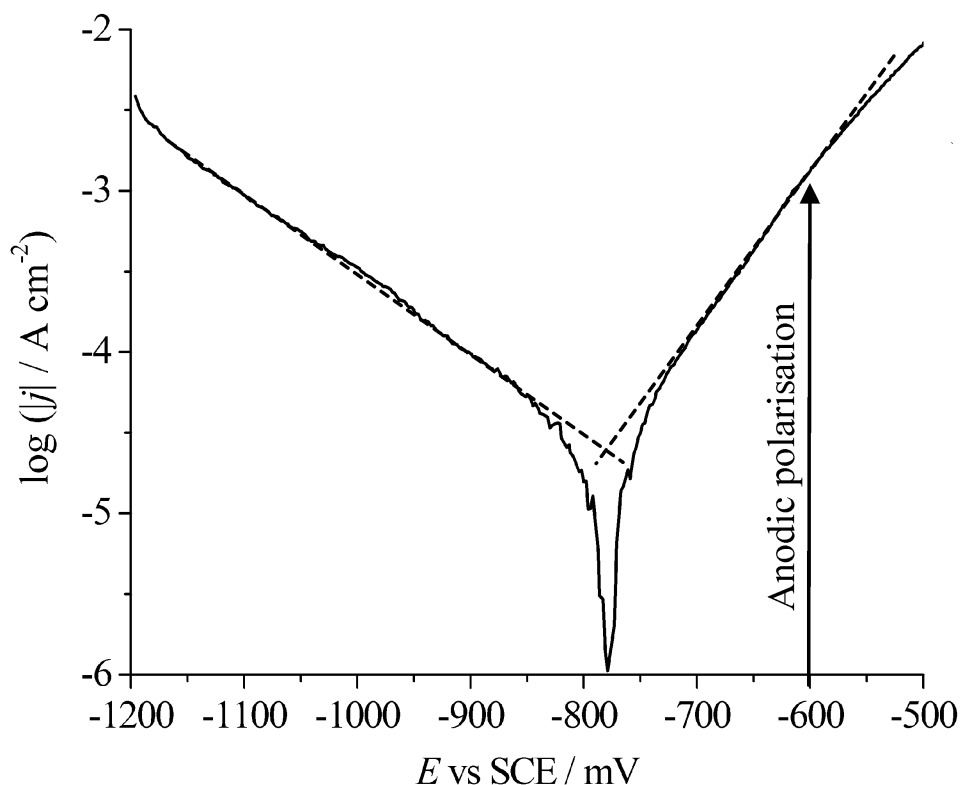


Figure 5.1 : Courbe de polarisation obtenue avec une électrode d'acier E24 placée dans une eau de mer simplifiée désaérée par un flux d'argon. $dE/dt = 1 \text{ mV/s}$. Les courbes en pointillés sont les droites de Tafel utilisées pour déterminer la densité de courant de corrosion.

La représentation du logarithme de la densité de courant en fonction du potentiel met clairement en évidence un comportement linéaire à la fois dans le domaine anodique et dans le domaine cathodique. La loi de Tafel est donc vérifiée, ce qui signifie que les deux réactions sont contrôlées par le transfert de charge. Ceci était attendu pour la réaction cathodique qui ne peut être, en l'absence d'oxygène, que la réduction de l'eau (H_2O et/ou H^+). Les pentes des droites de Tafel représentées en pointillés sur la figure 5.1 ont été mesurées à $b_a \sim 100 \text{ mV}$ pour la réaction anodique de dissolution du fer et $b_c \sim 200 \text{ mV}$ pour la réduction de l'eau. A l'intersection de ces deux droites sont déterminés le potentiel de corrosion $E_{\text{cor}} = -0,78 \text{ V/ECS}$ et la densité de courant de corrosion $j_{\text{cor}} = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ A cm}^{-2}$. La valeur de E_{cor} sera discutée plus loin. Quant à la valeur de j_{cor} , elle peut être comparée à des résultats de mesures de vitesse de corrosion faites en eau de mer aérée dans des conditions similaires, c'est-à-dire juste après l'immersion de l'acier [12]. La valeur de j_{cor} obtenue ici correspond à une vitesse de corrosion de $0,29 \text{ mm/an}$ tandis que les mesures effectuées en milieu aéré ont donné des valeurs de

l'ordre de 5,7 mm/an. La corrosion en conditions anoxiques est donc considérablement plus lente que celle se produisant en présence de O_2 dissous.

La polarisation anodique a été effectuée à un potentiel $E_{app} = -0,6$ V/ECS comme mentionné sur la figure 5.1. On note que des densités de courant anodiques de l'ordre de 1 mA cm^{-2} sont alors attendues. La figure 5.2 présente trois courbes chronoampérométriques obtenues à ce potentiel. On note que dans chaque cas la densité de courant atteint au départ, ou quelques minutes après le début de la polarisation, un maximum d'environ $0,7 - 0,8 \text{ mA cm}^{-2}$, ce qui est cohérent avec l'ordre de grandeur attendu.

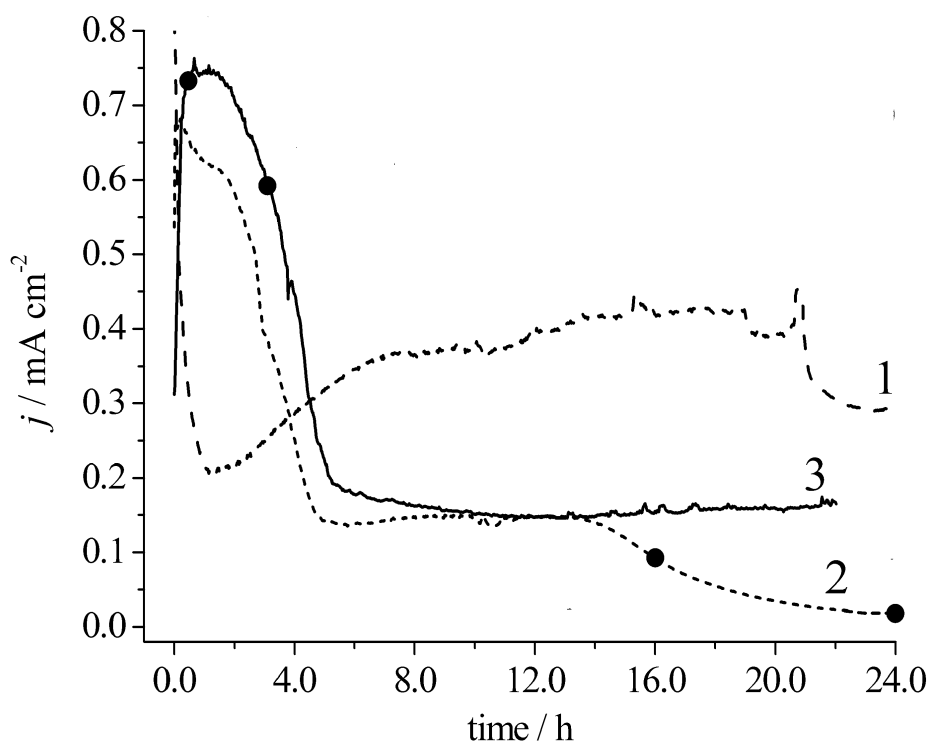


Figure 5.2 : Courbes chronoampérométriques obtenues lors de la polarisation anodique d'électrodes d'acier E24 placées dans une eau de mer simplifiée désaérée. $E_{app} = -0,6$ V/ECS.

Les courbes 1 et 2 ont été obtenues dans une cellule électrochimique en présence d'un flux d'argon qui provoque une agitation permanente de l'électrolyte. La courbe 3 a été obtenue avec une cellule placée en boîte à gants sous atmosphère d'argon (~ 1 ppm O_2) et l'électrolyte est donc dans ce cas réellement stagnant. La différence entre les courbes 1 et 2 illustre les variations observées avec la méthode utilisant un bullage d'argon. Nous pouvons supposer que cette différence est due au fait que l'agitation induite par le flux d'argon est difficilement maîtrisable, ce qui entraîne des problèmes de reproductibilité. La tendance

majoritaire est cependant illustrée par la courbe 2. Dans ce cas, la densité de courant décroît de 0,7 à environ 0,15 mA.cm⁻² en quatre heures, reste constante pendant dix heures et décroît de nouveau pour se stabiliser à 0,02 mA.cm⁻². La densité de courant en fin d'expérience est donc 35 fois plus faible qu'au départ. Ceci démontre que la couche de produits solides qui se forme sur l'électrode tend à bloquer la surface.

La courbe 3 obtenue en boîte à gants dans un électrolyte stagnant s'avère similaire à la courbe 2. La principale différence réside dans le fait que la densité de courant reste constante à 0,15 mA cm⁻² après sa décroissance initiale. Cependant, la composition et la morphologie des deux couches de rouille se sont avérées similaires (voir plus loin). A l'heure actuelle, cette différence entre les deux courbes n'est pas réellement expliquée.

Les disques noirs placés sur les courbes 2 et 3 de la figure 5.2 correspondent aux résultats des analyses des couches de rouille présentés ci-après. La figure 5.3 présente ainsi deux spectres Raman obtenus lors de l'analyse des produits présents sur la surface de l'acier après 15 minutes (spectre *a*) et 3 heures (spectre *b*) de polarisation en boîte à gants (se référer à la courbe 3).

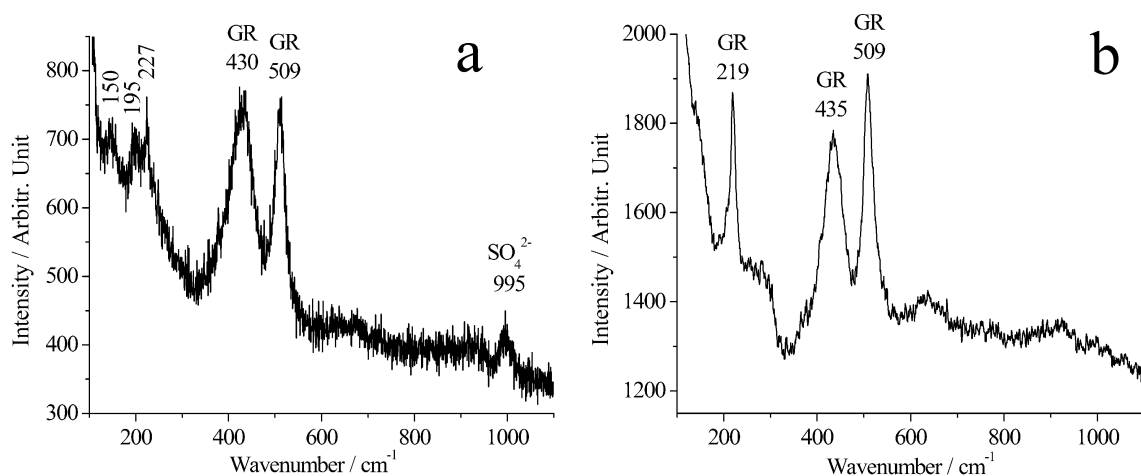


Figure 5.3 : Spectres Raman obtenus lors de l'analyse des produits présents sur une électrode d'acier polarisée 15 minutes (a) ou 3 heures (b) dans l'eau de mer simplifiée. Expérience réalisée en boîte à gants. $E_{app} = -0,6$ V/ECS. GR = rouille verte.

Ces deux spectres sont caractéristiques des différentes analyses réalisées en plusieurs endroits de la surface de l'électrode. Ainsi, nous n'avons pas observé d'hétérogénéité spatiale dans la couche de rouille. De même, des spectres similaires ont été obtenus à différentes

durées de polarisation (jusqu'à 26 heures). Ceci indique que la même phase se forme tout au long du processus de dissolution. Le spectre Raman de cette phase se compose, comme le montre la figure 5.3, de deux bandes de vibration principales, à 430-435 et 509 cm^{-1} . Ces deux bandes sont typiques des composés de type rouille verte [13-17] et sont présentes indépendamment de la rouille verte considérée. A l'inverse, d'autres bandes de vibration de plus faible intensité semblent liées à une variété particulière. Par exemple, le spectre de RV(Cl) se caractérise par trois bandes Raman supplémentaires à 238, 325 et 363 cm^{-1} [17]. Les spectres de la figure 5.3 ne présentent pas ces pics, ce qui indique qu'ils ne correspondent pas à la rouille verte chlorurée.

Le spectre *b* de la figure 5.3 se caractérise par un pic fin et intense à 219 cm^{-1} . Cependant, $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$ et $\text{RV}(\text{CO}_3^{2-})$ sont toutes deux caractérisées par un pic additionnel autour de 220 cm^{-1} [14-16], et la spectroscopie Raman ne permet donc pas de distinguer ces deux composés l'un de l'autre. Le spectre *a* de la figure 5.3 montre pourtant un pic caractéristique des ions SO_4^{2-} , situé à 995 cm^{-1} , mais ces anions sont probablement adsorbés à la surface des cristaux de rouille verte. En effet, les anions intercalés dans la structure en feuillets des rouilles vertes sont très difficiles à observer [18]. Ceci résulte probablement d'un phénomène de résonance entre les photons lasers incidents et les modes de vibration des feuillets d'hydroxyde de la structure rouille verte.

Il était donc nécessaire de recourir à une méthode de caractérisation apte à distinguer clairement ces deux rouilles vertes. La figure 5.4 présente ainsi un diffractogramme X de la couche de produits obtenue après 16 heures de polarisation dans un électrolyte désaéré par un flux d'argon (se référer à la courbe 2 de la figure 5.2).

Tout d'abord, deux pics très intenses se distinguent nettement du reste. L'un d'entre eux, situé à environ 45° (en 2 θ) est le pic principal du substrat. Il s'agit en l'occurrence du pic principal du fer alpha. D'autres pics de diffraction dus au substrat sont visibles. Ils sont annotés d'un *c* et correspondent à la cémentite Fe_3C . Le deuxième pic fin et intense, situé à environ 8° est le pic principal (001) de la rouille verte sulfatée. Il est accompagné de la plupart des pics de ce composé, repérés sur la figure 5.4 par les indices de Miller correspondants. Cette analyse démontre que la couche formée par polarisation anodique d'un acier en eau de mer simplifiée désaérée est essentiellement constituée de $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$.

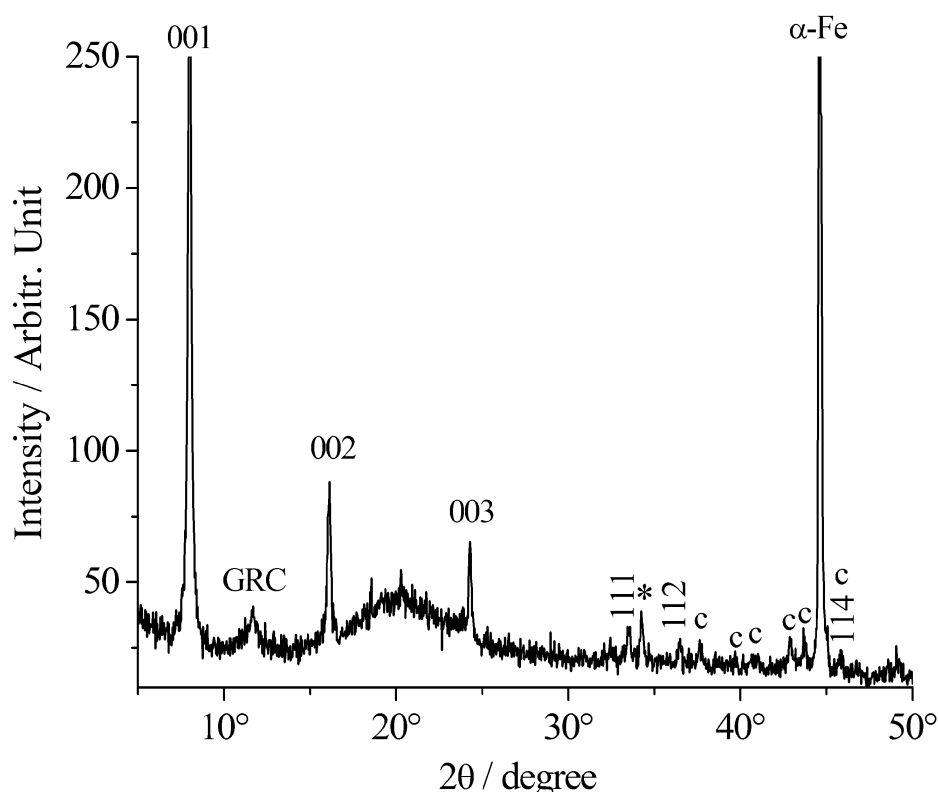


Figure 5.4 : Diffractogramme X obtenu lors de l'analyse des produits présents sur une électrode d'acier polarisée 16 heures dans l'eau de mer simplifiée. Expérience réalisée dans une cellule électrochimique sous flux d'argon. $E_{app} = -0,6$ V/ECS. Les pics de diffraction de $RV(SO_4^{2-})$ sont repérés par leurs indices de Miller. La bosse autour de 20° est due au glycérol utilisé pour limiter l'oxydation de la rouille verte pendant l'analyse. GRC = rouille verte carbonatée.

Outre les pics du substrat et ceux de la rouille verte sulfatée on ne distingue qu'un seul autre pic, peu intense et relativement large, situé à environ $11,7^\circ$ et annoté GRC. Cette position correspond à celle du pic principal de la rouille verte carbonatée [15]. Ainsi, une très faible proportion de ce composé accompagne $RV(SO_4^{2-})$. Ce résultat ne contredit pas l'analyse Raman puisque ces deux rouilles vertes ont des spectres très similaires.

On observera pour finir que le spectre *a* de la figure 5.3, obtenu après seulement 15 minutes de polarisation, est légèrement différent du spectre habituel de $RV(SO_4^{2-})$ [2,16], dont le spectre *b* est par contre parfaitement représentatif. Le troisième pic habituellement situé à 219 cm^{-1} semble ici scindé en deux pics à 195 et 227 cm^{-1} tandis qu'un pic supplémentaire apparaît à 150 cm^{-1} . Ces différences pourraient provenir de traits particuliers typiques des

cristaux de rouille verte se formant aux cours des premiers stades, liés par exemple à une faible cristallinité ou à des écarts à la stœchiométrie. Le rapport Fe(II)/Fe(III) de la rouille verte pourrait notamment être plus élevé au départ que le rapport nominal $\text{Fe(II)/Fe(III)} = 2$ [19]. Quoiqu'il en soit, ce spectre démontre que 15 minutes de polarisation sont suffisantes pour former une quantité détectable de rouille verte. Par contre, il n'a pas été possible de mettre en évidence un quelconque composé précurseur de la rouille verte, tel que Fe(OH)_2 dont la formation aurait pu être attendue.

La morphologie des couches de $\text{RV(SO}_4^{2-})$ ainsi formées a été étudiée au microscope électronique à balayage (MEB). La figure 5.5 présente quelques images caractéristiques obtenues avec un dépôt formé à l'issue de 24 heures de polarisation sous flux d'argon (se référer à la courbe 2 de la figure 5.2).

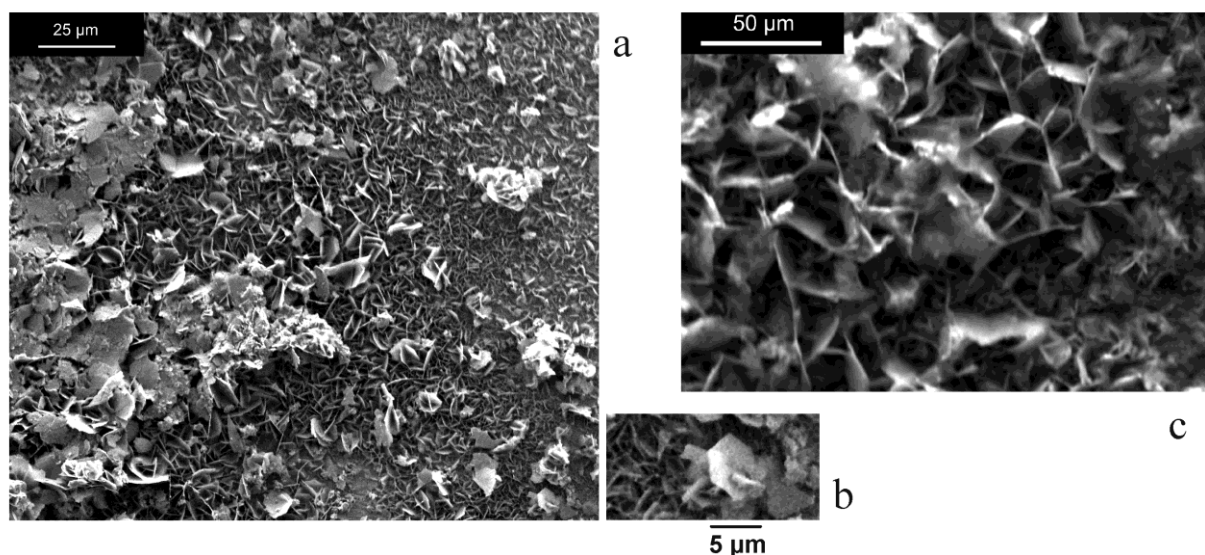


Figure 5.5 : Observation par MEB de la surface d'une électrode d'acier après polarisation anodique en eau de mer simplifiée pendant 24 heures. Expérience réalisée dans une cellule électrochimique sous flux d'argon. $E_{\text{app}} = -0,6 \text{ V/ECS}$.

La photographie 5a montre un assemblage de plaquettes hexagonales qui semblent en majorité être orientées perpendiculairement à la surface et non posées « à plat » dessus. Leur largeur est d'environ 5 à 10 μm et leur épaisseur inférieure à 1 μm . L'image 5b est un agrandissement du coin inférieur droit de la photo précédente. On y distingue clairement la forme hexagonale d'une plaque fortement inclinée. Cette morphologie est tout à fait typique des cristaux de $\text{RV(SO}_4^{2-})$ [20]. Les analyses élémentaires effectuées par

spectrométrie à dispersion d'énergie lors de l'analyse MEB sur de tels cristaux ont donné un rapport atomique Fe/S proche de 7, c'est-à-dire légèrement supérieur à la valeur nominale $\text{Fe/S} = 6$ [19]. Cela confirme néanmoins que ces cristaux sont bien ceux de $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$. La différence observée entre la valeur mesurée et la valeur théorique pourrait être due à une légère oxydation de la rouille verte pendant son transport du laboratoire vers le centre commun d'analyse où se trouve le MEB (cf. chapitre 2). Une telle oxydation pourrait avoir engendré une fine couche de FeOOH à la surface des cristaux de rouille verte.

La photographie 5c montre plus clairement comment les plaquettes hexagonales sont liées les unes aux autres pour former une structure en « château de cartes ». La structure cristalline en feuillets des rouilles vertes est, rappelons-le, constituée par l'empilement de feuillets d'hydroxyde chargés positivement qui alternent avec des intercouches constituées d'anions et de molécules d'eau. Les faces des cristaux sont donc chargées électriquement. Si les côtés des plaquettes sont également chargés électriquement et portent des charges de signe contraire alors les plaquettes vont tendre à s'assembler pour conduire à cette morphologie en « château de cartes ». On notera par conséquent que les plaquettes visibles sur la figure 5.5.a, orientées perpendiculairement au substrat, sont liées à des plaquettes qui doivent être parallèles au substrat et ainsi de suite.

La couche de $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$ est loin d'être compacte et les larges espaces laissés libres entre les plaquettes hexagonales de ce « château de cartes » favorisent probablement la colonisation de la couche de rouille par les micro-organismes, comme observé en corrosion marine [1,2].

En conclusion, le principal produit formé sur une électrode d'acier par polarisation anodique en eau de mer simplifiée désaérée est $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$. La rouille verte se forme donc en l'absence d'oxygène. $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$ se forme également en présence d'oxygène mais s'oxyde rapidement en donnant majoritairement la lépidocrocite. Le principal effet de l'absence d'oxygène est donc la suppression de ce phénomène d'oxydation mais le premier stade du processus, à savoir la formation de $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$, reste inchangé.

On notera par ailleurs qu'aucune phase chlorurée n'a été observée. En particulier, la variété chlorurée des rouilles vertes n'a pas été détectée. Ceci est parfaitement en accord avec les analyses effectuées sur des coupons laissés en eau de mer naturelle [1,2 et chapitre 4] et avec des expériences menées en laboratoire en milieux aérés [21]. Rappelons que les anions divalents confèrent à la structure de type rouille verte une plus grande stabilité et qu'ils sont toujours intégrés préférentiellement aux anions monovalents au sein de cette structure [22-

24]. Par contre, l'étude d'objets archéologiques ferreux immergés pendant 2000 ans dans l'eau de mer a montré que le métal était alors recouvert par une couche épaisse essentiellement constituée d'hydroxychlorure ferreux $\beta\text{-Fe}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ [25]. Aucune rouille verte n'a été détectée. Ceci indique que les mécanismes de la corrosion marine sont totalement différents après des durées d'immersion (très) longues.

I.2. Rôle du rapport des concentrations en sulfate et carbonate

Le diffractogramme X de la figure 5.4 a révélé qu'une proportion très mineure de rouille verte carbonatée se formait conjointement à la rouille verte sulfatée. Cette particularité avait également été mise en évidence lors de l'analyse de coupons d'acier immergés 6-12 mois sur sites portuaires [1,2]. En réalité, nous savons que l'eau de mer contient trois espèces anioniques susceptibles de donner lieu à une rouille verte : Cl^- , SO_4^{2-} et $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$. Comme dit au paragraphe précédent, $\text{RV}(\text{Cl}^-)$ ne se forme pas car les anions divalents sont incorporés préférentiellement dans la structure des rouilles vertes. Mais il est également admis que, parmi les anions divalents, CO_3^{2-} est celui qui confère à la structure de type rouille verte une plus grande stabilité [22-24]. $\text{RV}(\text{CO}_3^{2-})$ se forme donc préférentiellement à toute autre rouille verte. Dans l'eau de mer simplifiée utilisée précédemment, comme dans l'eau de mer naturelle, le rapport des concentrations en sulfate et carbonate $[\text{SO}_4^{2-}]/[\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}]$ est élevé (= 10), tandis que la concentration en espèces carbonates est faible (= 0,003 mol.L⁻¹). L'un ou l'autre de ces deux facteurs gouverne donc les processus compétitifs conduisant à l'une ou l'autre de ces rouilles vertes.

Pour étudier ces processus nous avons appliqué à d'autres électrolytes la méthodologie utilisée dans l'eau de mer simplifiée. Nous avons considéré tour à tour trois électrolytes uniquement constitués de Na_2SO_4 et NaHCO_3 (cf. chapitre 2). Dans un premier temps nous avons repris l'eau de mer simplifiée en omettant simplement NaCl . Comme attendu, les résultats (non présentés) se sont avérés très similaires à ceux obtenus dans l'eau de mer simplifiée. Dans un deuxième temps, nous avons multiplié les concentrations par 10. Cet électrolyte se caractérise donc par le même rapport $[\text{SO}_4^{2-}]/[\text{HCO}_3^- + \text{CO}_3^{2-}] = 10$ que l'eau de mer simplifiée et par des concentrations en Na_2SO_4 de 0,3 mol.L⁻¹ et en NaHCO_3 de 0,03 mol.L⁻¹. Nous allons développer ici les résultats obtenus dans cette solution.

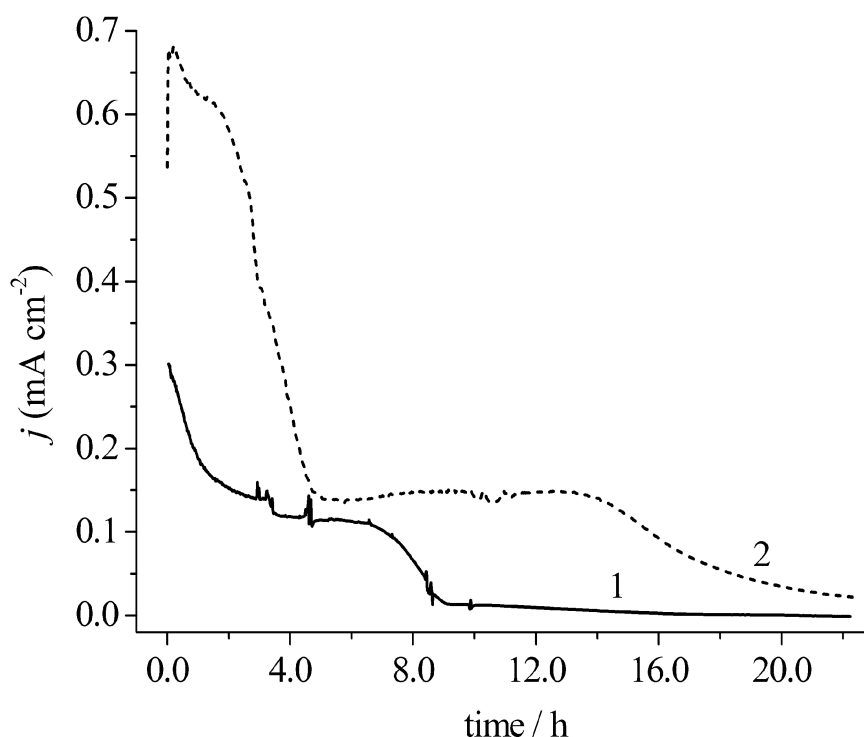


Figure 5.6 : Courbe chronoampérométrique (1) obtenue lors de la polarisation anodique d'une électrode d'acier E24 placée dans un électrolyte sulfaté et carbonaté ($[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ et $[\text{NaHCO}_3] = 0,03 \text{ mol.L}^{-1}$), comparée à celle obtenue (2) dans l'eau de mer simplifiée. Expériences réalisées dans une cellule électrochimique sous flux d'argon. $E_{\text{app}} = -0,6 \text{ V/ECS}$.

La figure 5.6 compare la courbe chronoampérométrique obtenue dans ce nouvel électrolyte avec celle obtenue dans les mêmes conditions de désaération en eau de mer simplifiée (courbe 2 de la figure 5.2). On note que la tendance générale est la même. La densité de courant a diminué rapidement pour se stabiliser à environ $0,1 \text{ mA cm}^{-2}$ pendant 4 heures avant de diminuer de nouveau pour tendre vers une valeur proche de zéro. La densité de courant initiale est cependant plus faible dans cet électrolyte que dans l'eau de mer simplifiée, et sa décroissance est plus rapide.

Le diffractogramme X obtenu à l'issue de l'analyse de la couche de rouille formée en fin d'expérience, soit après 22 heures de polarisation anodique, est présenté sur la figure 5.7. Les trois pics principaux de la rouille verte sulfatée et celui du fer alpha sont clairement visibles. Ils sont accompagnés par le pic principal (GRC) de la rouille verte carbonatée. Ce pic est plus fin et proportionnellement plus intense que sur le diffractogramme du produit

obtenu en eau de mer simplifiée (figure 5.4). Ici, l'intensité de ce pic vaut environ 1/5 de celle du pic principal (001) de $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$ alors qu'elle n'en vaut que 1/13 dans le cas précédent.

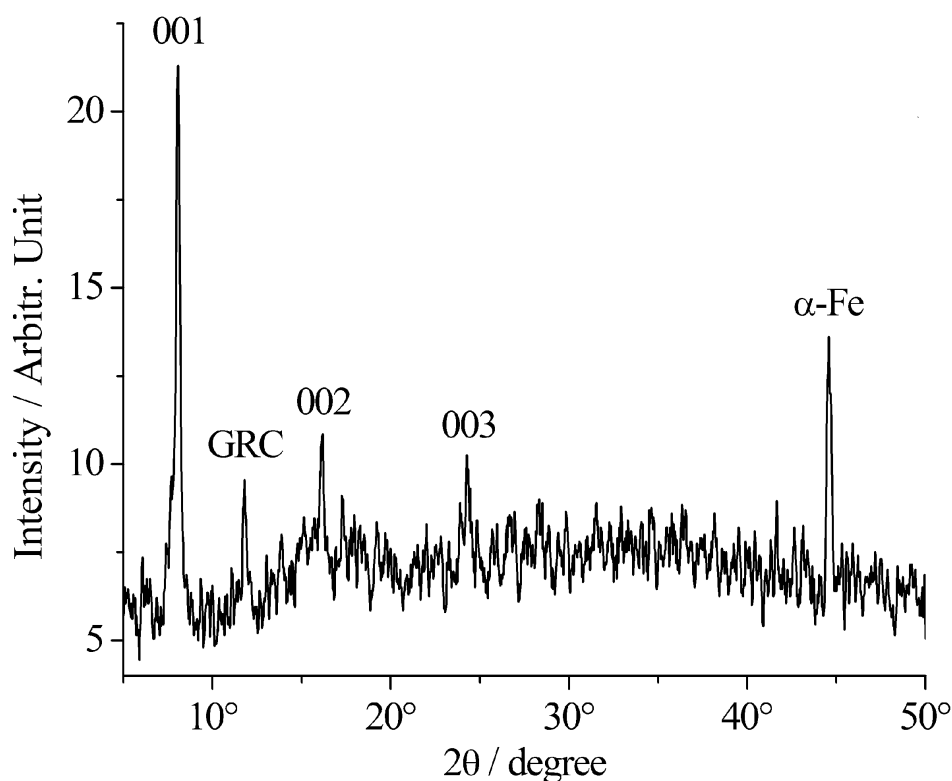


Figure 5.7 : Diffractogramme X obtenu lors de l'analyse des produits présents sur une électrode d'acier polarisée 22 heures dans un électrolyte sulfaté et carbonaté ($[\text{Na}_2\text{SO}_4] = 0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ et $[\text{NaHCO}_3] = 0,03 \text{ mol.L}^{-1}$). Expérience réalisée dans une cellule électrochimique sous flux d'argon. $E_{\text{app}} = -0,6 \text{ V/ECS}$. Les pics de diffraction de $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$ sont repérés par leurs indices de Miller. GRC = rouille verte carbonatée.

Ces résultats indiquent que la prédominance de $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$ dans l'eau de mer est due à la valeur élevée du rapport de concentrations $[\text{SO}_4^{2-}]/[\text{HCO}_3^-]$. Néanmoins, la faible concentration en carbonate ($0,003 \text{ mol.L}^{-1}$) semble défavoriser encore plus la formation de $\text{RV}(\text{CO}_3^{2-})$.

Enfin, le troisième électrolyte considéré était caractérisé par un rapport de concentrations $[\text{SO}_4^{2-}]/[\text{HCO}_3^-]$ égal à 1 et une concentration en sulfate égale à celle de l'eau de mer simplifiée, soit $[\text{Na}_2\text{SO}_4] = [\text{NaHCO}_3] = 0,03 \text{ mol.L}^{-1}$. L'analyse par diffraction des rayons X a donné le résultat présenté sur la figure 5.8.

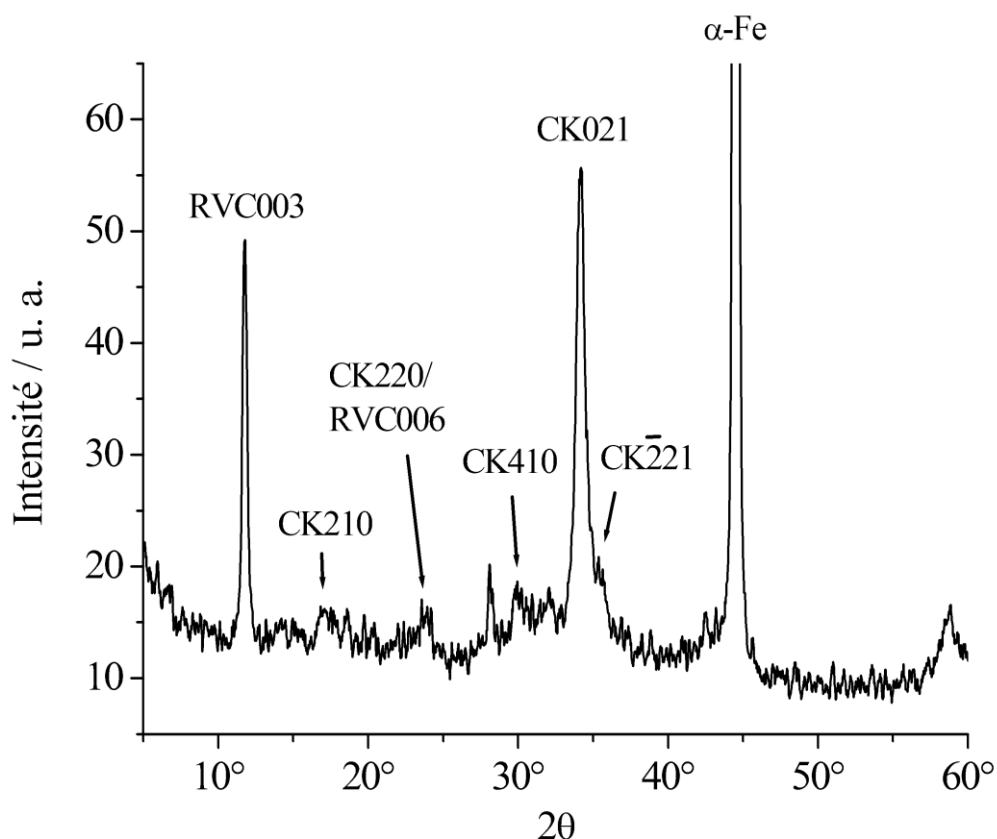


Figure 5.8 : Diffractogramme X des produits formés sur acier E24 après 24 heures de polarisation anodique dans la solution telle que $[\text{Na}_2\text{SO}_4] = [\text{NaHCO}_3] = 0,03 \text{ mol.L}^{-1}$. Dépôt obtenu en boîte à gants. $E_{\text{app}} = -0,6 \text{ V/ECS}$. RVC = rouille verte carbonatée et CK = chukanovite.

Cette analyse démontre que, dans ces conditions de concentrations en sulfate et carbonate, la rouille verte sulfatée ne se forme plus. Sur le diffractogramme apparaît le pic principal du substrat, particulièrement intense, et les principaux pics de deux phases carbonatées, la chukanovite (CKhkl) et la rouille verte carbonatée (RVChkl). La chukanovite est l'hydroxycarbonate de Fe(II) de composition $\text{Fe}_2(\text{OH})_2\text{CO}_3$ [26,27]. Elle est clairement

identifiée par son pic principal CK021 et quatre pics annexes, CK210, CK220, CK410 et CK $\bar{2}$ 21. La rouille verte carbonatée est essentiellement identifiée par son pic principal RVC003.

En conclusion, dans cette solution où la concentration en carbonates égale la concentration en sulfates, les deux produits formés par polarisation anodique de l'acier sont des produits carbonatés. La rouille verte carbonatée se forme au détriment de la rouille verte sulfatée, bien que les concentrations en sulfate et carbonate soient identiques. Ceci illustre le fait que les ions carbonates sont ceux qui confèrent à la structure de type rouille verte la plus grande stabilité.

II. Analyses de la couche composite « rouille/micro-organismes » formée sur un coupon d'acier E24 après 11 ans d'immersion.

Plusieurs séries de coupons d'acier E24 avaient été placées en 1999 sur le site du port des Minimes de La Rochelle dans le cadre de la première thèse en corrosion marine du LEMMA. A l'issue de cette thèse, les coupons non utilisés ont été laissés en place pour des travaux ultérieurs. Un de ces coupons a été récupéré en 2010 dans le cadre de notre travail. L'ensemble de la procédure est décrit au chapitre 2. Rappelons que les coupons sont conservés à -80°C avant analyse, ce qui garantit qu'aucune évolution n'a lieu pendant cette période de stockage. D'autre part, cette procédure permet de travailler avec une couche de rouille gelée, parfaitement solide, ce qui facilite son analyse en coupe transverse. La stratification éventuelle peut ainsi être mise en évidence.

II.1. Identification des produits de corrosion

L'analyse physico-chimique de la couche de rouille recouvrant le coupon immergé 11 ans, épaisse d'environ 7 à 8 mm, a été effectuée essentiellement par micro-spectroscopie Raman. Elle a demandé l'acquisition de plus de 50 spectres et nous ne montrerons donc ici qu'une sélection de résultats significatifs. Schématiquement, nous pouvons distinguer trois strates principales, comme illustré sur la figure 5.9. En partie externe, en contact avec l'eau de mer, se trouve une strate de couleur orangée (a) ne contenant que des produits à base de Fe(III), à savoir la goethite, la magnétite et la lépidocrocite. La goethite (spectre a) semble être le produit majoritaire.

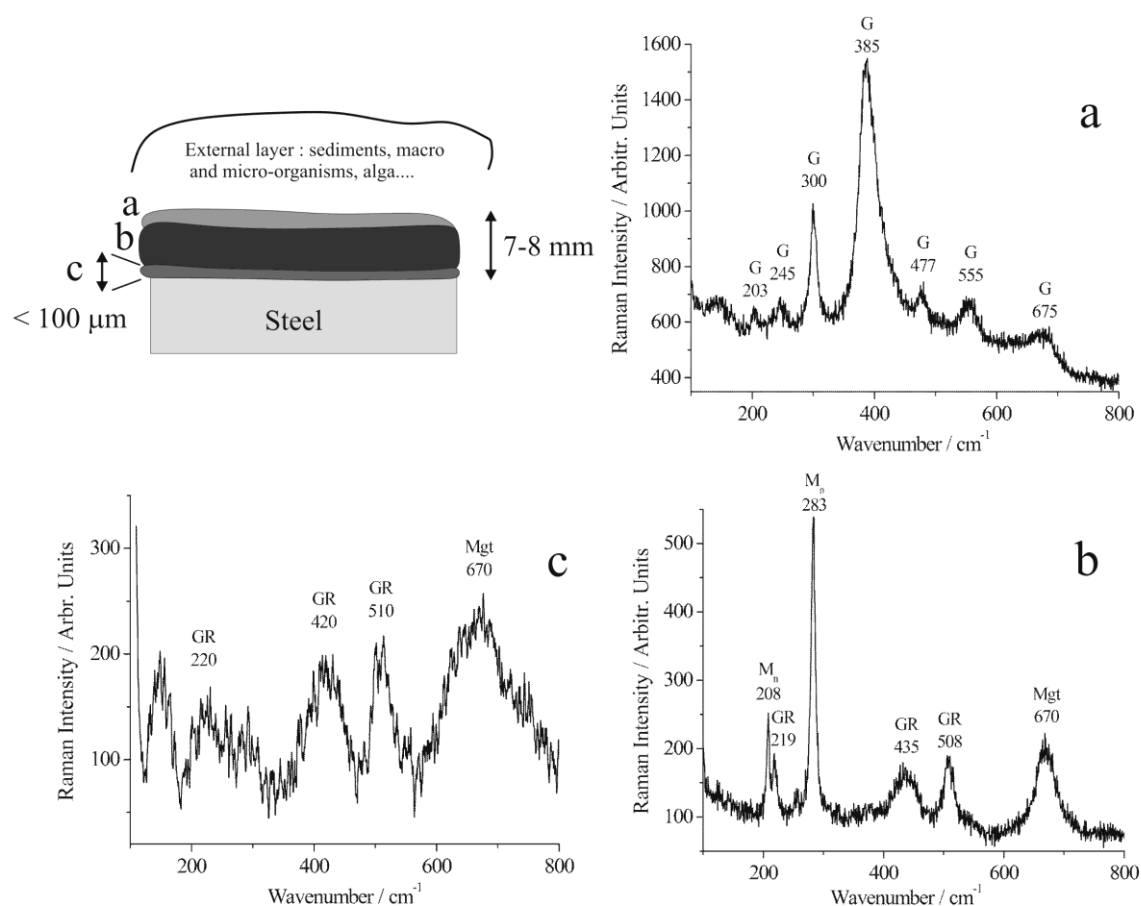


Figure 5.9 : Exemples de spectres Raman obtenus lors de l'analyse de la couche de rouille recouvrant un coupon d'acier E24 après 11 ans d'immersion en eau de mer et schéma simplifié décrivant la stratification de cette couche. G = goethite α -FeOOH, Mgt = magnétite Fe_3O_4 , GR = rouille verte sulfatée $\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2(\text{OH})_{12}\text{SO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ et M_n = mackinawite nanocristalline FeS . (a) : strate externe de couleur orangée ; (b) : strate centrale épaisse; (c) : strate interne noire.

La strate centrale (*b*) représente l'essentiel de la couche. Son analyse en coupe transverse le long d'une ligne droite a donné l'alternance de spectres suivante, de l'extérieur vers l'intérieur (le produit majoritaire est en caractères gras) :

- | | |
|---|---|
| 1. FeS + RV(SO ₄ ²⁻) + Fe ₃ O ₄ | 4. FeS + RV(SO₄²⁻) + Fe₃O₄ + γ-FeOOH |
| 2. RV(SO₄²⁻) + FeS | 5. FeS |
| 3. RV(SO₄²⁻) + FeS | 6. FeS + RV(SO₄²⁻) + Fe₃O₄ + γ-FeOOH |

Comme l'illustre le spectre *b*, cette strate centrale est donc essentiellement constituée de 3 phases, la rouille verte, la mackinawite et la magnétite. Ce sont les trois phases susceptibles de se former en conditions anoxiques. Par ailleurs, la mackinawite et la rouille verte étant sensibles à l'action oxydante de O₂, leur présence signifie que l'oxygène ne parvient pratiquement pas à accéder à cette zone de la couche de rouille. Nous avons cependant détecté ici et là de la lépidocrocite, nécessairement produite par la réaction de RV(SO₄²⁻) et/ou FeS avec l'oxygène. Etant donné la nature très hétérogène de la couche composite « rouille/micro-organismes », il est probable que l'oxygène puisse pénétrer localement au sein de cette strate interne, notamment via des fissures.

La séquence de spectres observée ne semble pas suivre de logique apparente. Nous pensons qu'elle traduit simplement l'hétérogénéité de cette strate intermédiaire.

Enfin, dans une très fine (épaisseur ~< 100 μm) strate interne au contact du métal (*c*), nous n'avons détecté que la rouille verte et la magnétite. Les sulfures de fer ne semblent pas être présents au voisinage immédiat de l'acier. Ceci pourrait indiquer que les BSR colonisent, à ce stade de développement du système de corrosion, des régions plus externes de la couche de rouille. Cela apparaît d'ailleurs logique puisque l'activité métabolique et surtout le développement de ces micro-organismes doivent être alimentés par différentes espèces chimiques ne pouvant provenir que du milieu extérieur. Ainsi, lorsque la couche de rouille atteint une épaisseur très importante, il se pourrait que les BSR soient amenées à se rapprocher du milieu extérieur. Dès lors, la précipitation de FeS à partir des espèces sulfures produits par les BSR ne pourrait plus se produire à proximité de la surface métallique.

Ceci va être confirmé par les analyses microbiologiques.

II.2. Analyses microbiologiques et moléculaires de la couche composite « micro-organismes / produits de corrosion »

II.2.1. Abondance bactérienne

II.2.1.1. Estimation du nombre total de bactéries

L'abondance de la flore bactérienne totale a été estimée au sein des différentes strates de la couche composite « rouille/micro-organismes » par microscopie à épifluorescence. Les résultats sont présentés dans la figure 5.10.

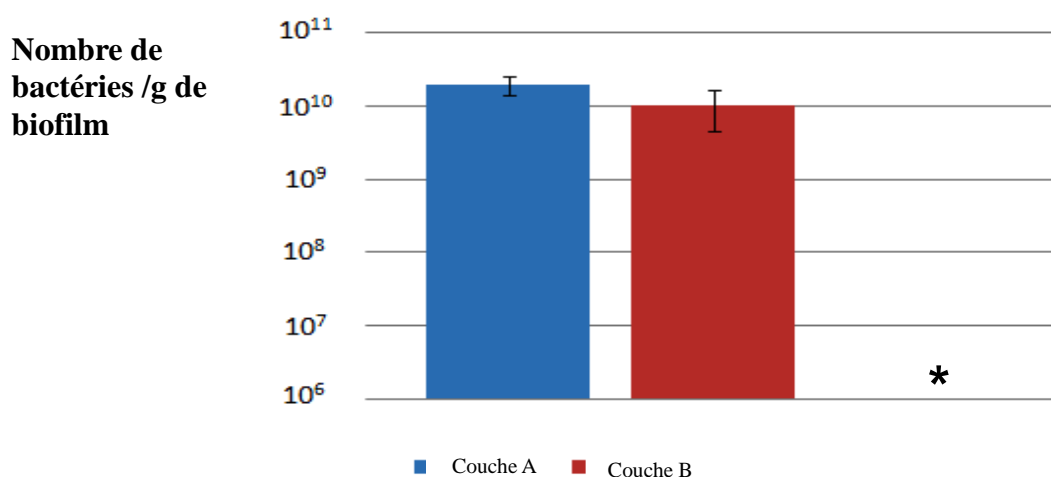


Figure 5.10 : Concentration bactérienne totale en fonction de la couche de biofilm composite. (*) Nombre de bactéries insuffisant dans la couche C pour pouvoir déterminer correctement la concentration bactérienne

On peut voir grâce à l'histogramme de la figure 5.10 que la concentration bactérienne est proche de 10^{10} bactéries/g de biofilm, que ce soit dans la strate A ($2 \cdot 10^{10}$ bactéries/g) ou dans la strate B (10^{10} bactérie/g). La concentration bactérienne est donc notablement plus élevée que dans les couches de rouille recouvrant les échantillons immergés pendant des temps plus courts (cf. chapitre 4). Rappelons que la densité bactérienne était comprise entre $2 \cdot 10^8$ bactéries/g de biofilm pour 15 jours d'immersion et $7,2 \cdot 10^8$ bactéries/g de biofilm pour 2 mois d'immersion.

La strate la plus interne (C) n'est pas représentée sur la figure car le seuil de détection de la méthode n'a pas permis de mettre en évidence la faible concentration bactérienne. Ce

seuil de détection est lié à la nécessité de diluer l'échantillon, dilution qui permet de limiter les artefacts liés aux cristaux et agrégats issus des produits de corrosion. Ce seuil se situe à $1,6.10^7$ bactéries/g de biofilm, de sorte que l'on peut simplement dire que la concentration bactérienne totale au sein de cette strate est inférieure à cette valeur. Dans cette strate interne de la couche composite « rouille/micro-organismes », la population bactérienne est probablement restreinte en raison des conditions particulières qui y règnent : faible taux d'oxygénation, apport en nutriments limité, concentration en fer et sulfures dissous élevée, pH probablement plus bas, etc.

II .2.1.2. Estimation du nombre de bactéries cultivables

Les résultats présentés sur la figure 5.11 ont été obtenus par culture des bactéries sur milieu gélosé. Comme précédemment exposé dans le chapitre 4, les bactéries aérobies ont été cultivées sur milieu « Marine Agar » (MA) tandis que les souches anaérobies ont été cultivées en parallèle sur milieu MA et « Baar » afin de favoriser les bactéries sulfato-réductrices.

On peut constater sur cette figure que pour la strate A en contact avec l'eau de mer, la population bactérienne cultivable est majoritairement constituée de souches aérobies ($9,6.10^6$ UFC/g de biofilm). La concentration bactérienne de la flore cultivable anaérobie est d'environ deux ordres de grandeur plus faible, avec $3,6.10^4$ et $3,2.10^4$ UFC/g de biofilm pour les milieux MA et Baar respectivement. Cependant, on voit qu'au sein de la couche B, les concentrations de bactéries cultivables varient peu quelque soient les conditions d'oxygénation ou de milieu de culture : $4,4.10^4$ UFC/g de biofilm en MA aérobie pour $3,7.10^4$ UFC/g de biofilm en MA anaérobie et $5,0.10^4$ UFC/g de biofilm en milieu Baar anaérobie. Aucune souche n'a pu être isolée de la couche I.

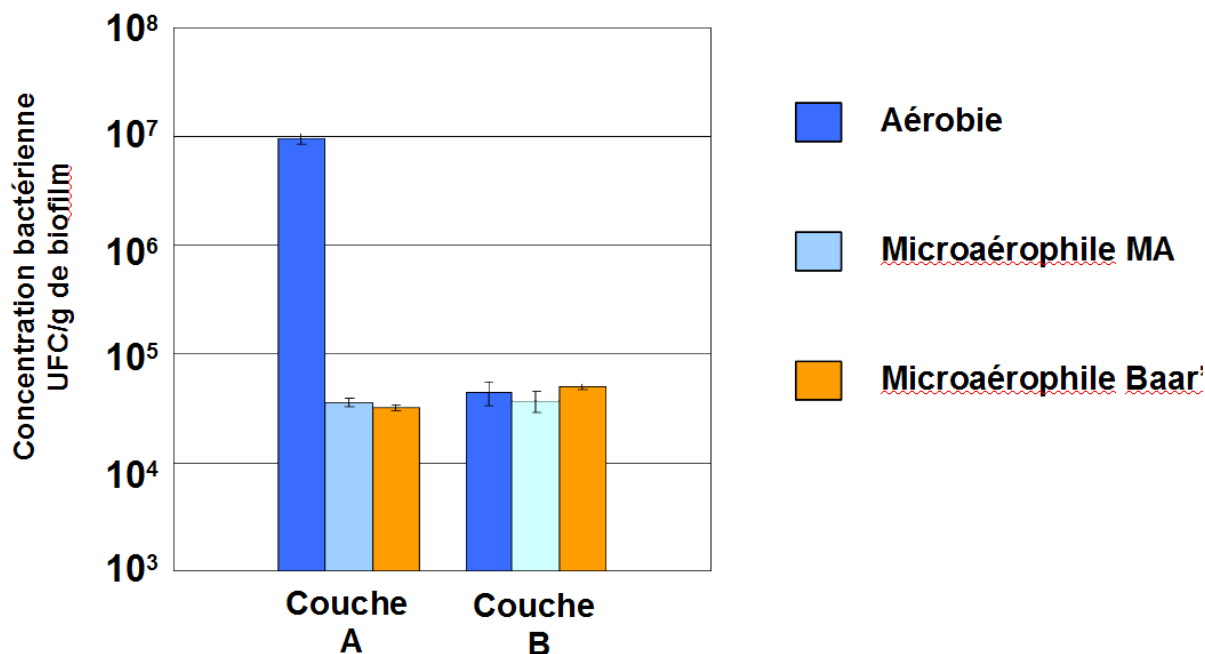


Figure 5.11 : Nombre de bactéries cultivables de la couche composite « rouille/micro-organismes » du coupon immergé 11 ans, en fonction des conditions d'oxygénation et du milieu de culture (MA = milieu de culture « marine agar », Baar = milieu de culture de Baar modifié pour réducteurs de sulfates).

Si l'on compare ces résultats à ceux obtenus aux temps d'immersion courts, on constate que le nombre de bactéries aérobies cultivables est plus élevé dans la strate A ($\sim 10^7$ UFC/g de biofilm) qu'il ne l'était dans la couche composite aux temps courts ($\sim 10^6$ UFC/g de biofilm). C'est bien entendu l'accroissement de la concentration en bactéries aérobies dans les strates externes qui permet la consommation de l'oxygène dissous et engendre des conditions anoxiques dans les strates les plus internes. D'ailleurs, la strate B est à l'inverse plus pauvre en bactéries aérobies cultivables que la couche composite observée pour les temps d'immersion plus courts.

La flore cultivable anaérobie est restée relativement stable, la concentration bactérienne passant de 10^5 UFC/g de biofilm après 2 mois d'immersion à $5 \cdot 10^4$ UFC/g de biofilm au sein de la couche B (sur milieu Baar).

II.2.1.3. Estimation de la fraction de bactéries cultivables.

La proportion de bactéries cultivables est présentée dans le tableau 5.1.

	Fraction de bactéries cultivables en pourcentage (%)		
	Aérobie	Anaérobie	
Couche	MA	MA	ATCC
A	0,05	0,0002	0,0002
B	0,0004	0,0003	0,0005

Tableau 5.1 : Proportion de bactéries cultivables par rapport au nombre total de bactéries dans le biofilm, en fonction des conditions de culture et de la strate de la couche composite « rouille/micro-organismes » considérée.

On constate que la fraction cultivable représente une très faible proportion de la flore bactérienne totale car à l'exception des bactéries aérobies de la couche A, elle ne représente que 2.10^{-4} à 5.10^{-4} % de la flore totale. En aérobiose sur milieu MA, la fraction cultivable est 100 à 200 fois plus élevée que dans les autres conditions. Ceci peut être expliqué par les conditions moins sélectives du milieu de développement (conditions aérobies en milieu riche) comparé aux conditions plus sélectives de croissance au sein du biofilm composite. Si on compare ces résultats à ceux obtenus entre 1 semaine et 2 mois, on peut noter qu'après 11 ans la fraction cultivable est beaucoup moins importante excepté en aérobiose sur MA où elle conserve une valeur similaire à sa valeur initiale. Ces résultats sont en accord avec ceux reportés dans la littérature [par exemple 1,28].

II.2.2. Diversité des bactéries cultivables isolées

II.2.2.1. Identification des bactéries cultivables isolées

Les séquences d'ADNr16S obtenues à partir des souches cultivées ont été comparées aux bases de données internationales afin de déterminer les espèces les plus proches (avec le pourcentage d'homologie). Cette caractérisation a ensuite permis de construire des arbres phylogénétiques pour chaque strate de la couche composite « rouille/micro-organismes » à l'aide du logiciel PHYLIP-3.69.

L'arbre phylogénétique obtenu pour la strate A est présenté dans la figure 5.12 et les souches sont regroupées par classe dans la figure 5.13.

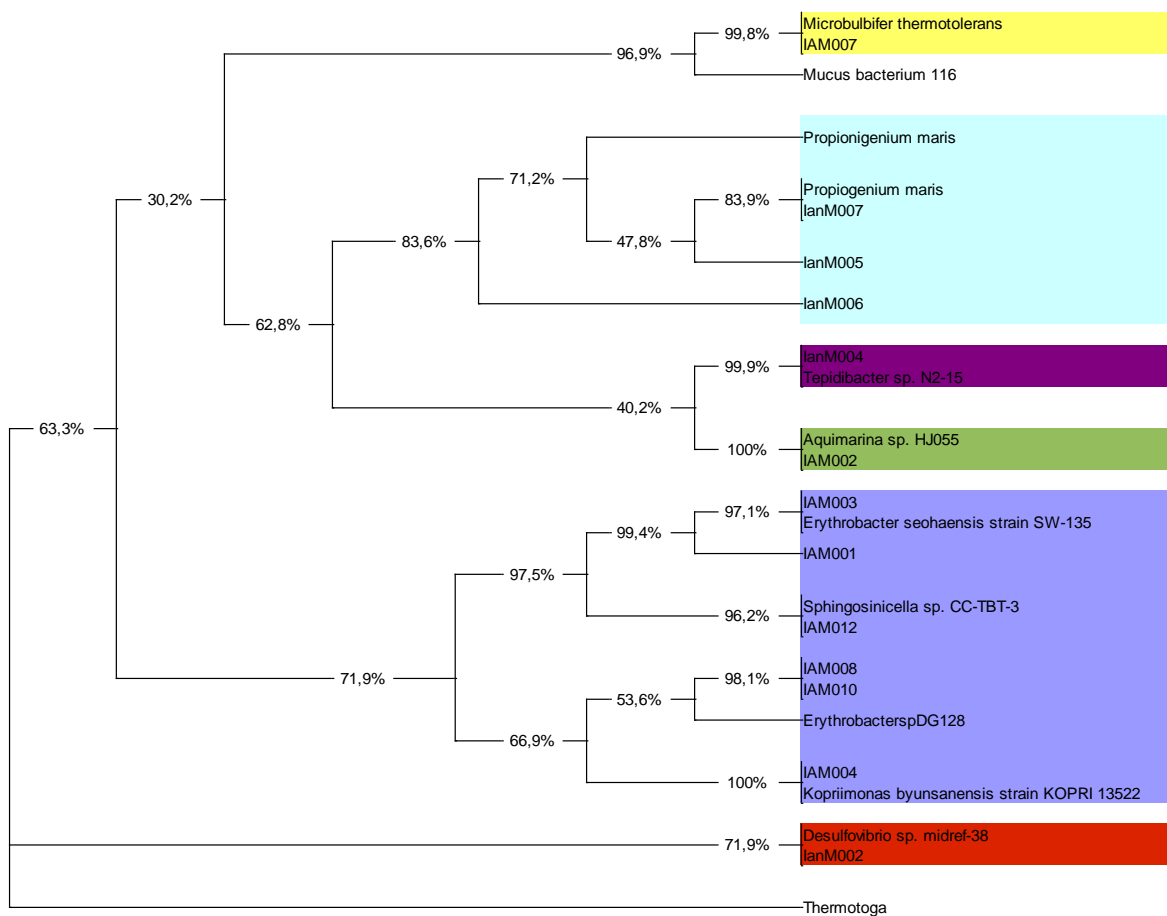


Figure 5.12 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ARNr16S des souches cultivables issues de la strate A du coupon immergé 11 ans. Code couleur :

α-Proteobacteria	γ-Proteobacteria	δ-Proteobacteria
Clostridia	Flavobacteria	Fusobacteria

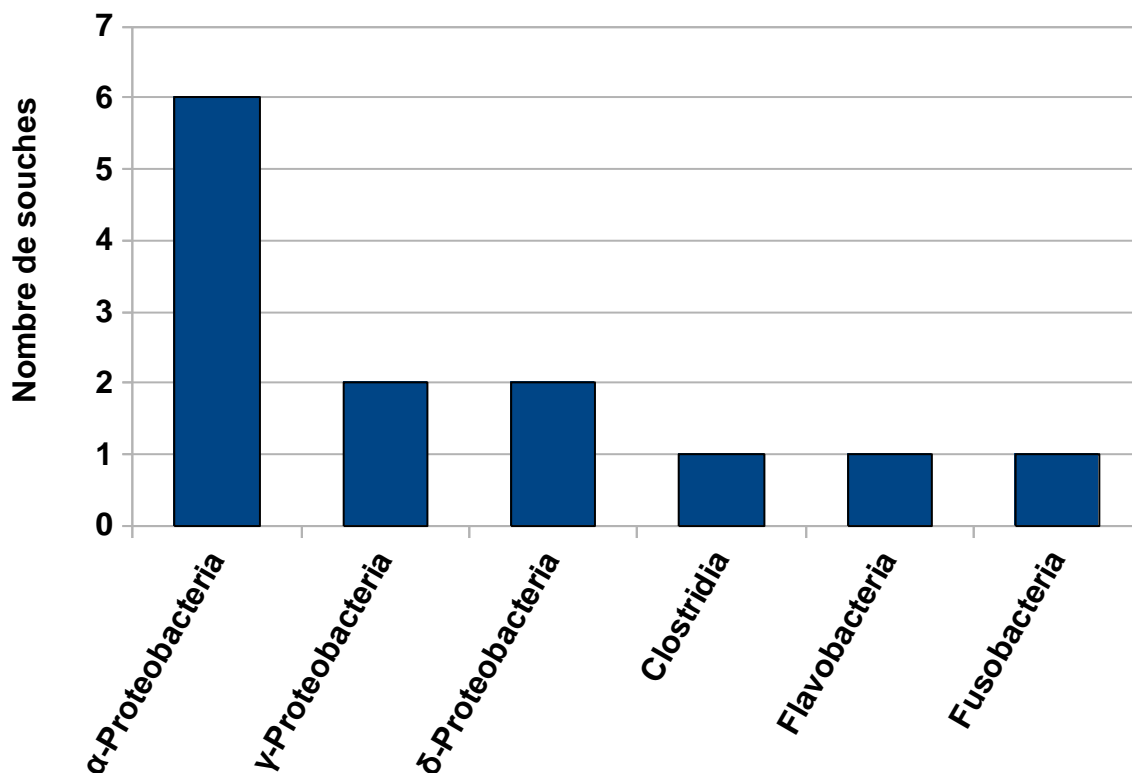


Figure 5.13 : Répartition par classe des souches caractérisées issues de la strate A du coupon immergé 11 ans.

Les souches cultivables isolées de la strate A sont en majorité de classe *α -Proteobacteria* (6 souches sur 13). On note l'apparition de bactéries appartenant aux classes *Clostridia*, *Fusobacteria* et *δ -Proteobacteria* qui n'étaient pas représentées dans la flore cultivable issues des coupons immergés de 1 semaine à 2 mois. L'espèce associée à la classe *δ -Proteobacteria* appartient au genre *Desulfovibrio* qui est le genre le plus représenté parmi les bactéries sulfato-réductrices. Sans surprise eu égard aux analyses par micro-spectroscopie Raman, une souche de BSR est donc formellement identifiée ici.

L'arbre phylogénétique obtenu pour la couche B est présenté sur la figure 5.14 et les souches sont regroupées par classe dans la figure 5.15.

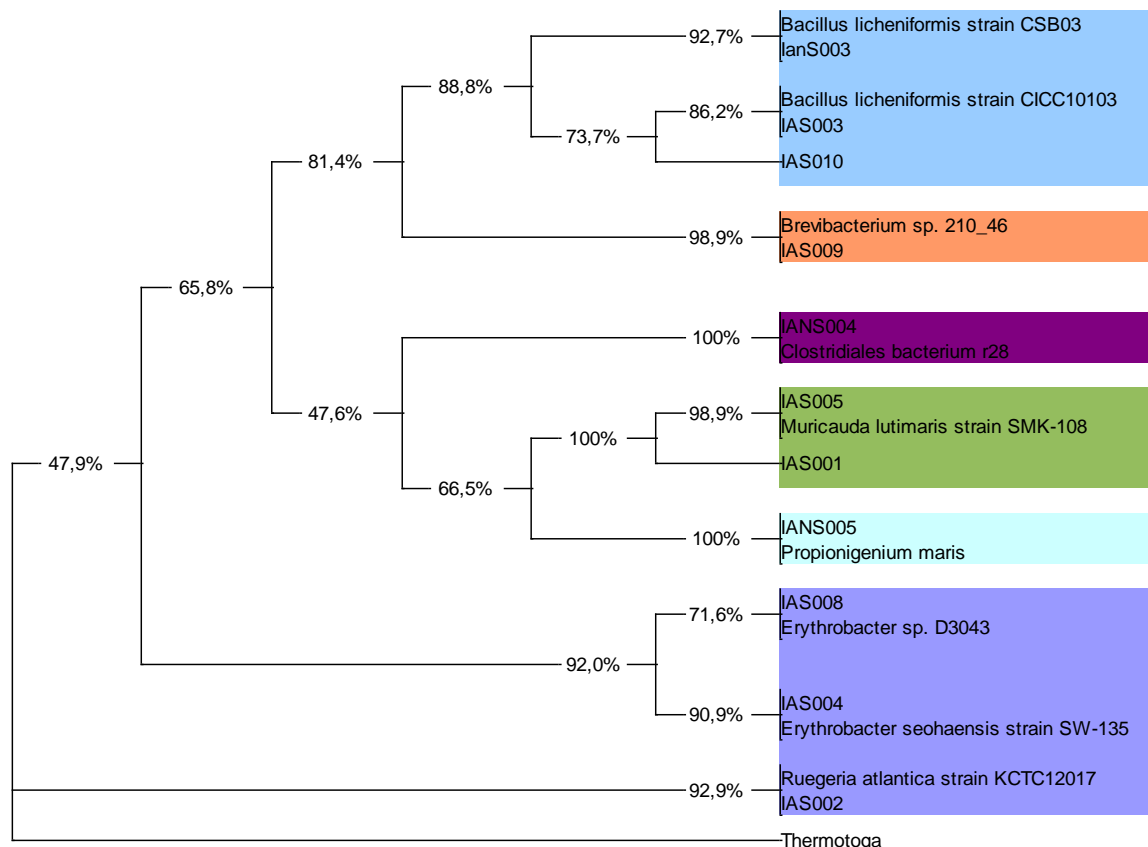


Figure 5.14 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ARNr16S des 11 souches cultivables issues de la strate S du coupon immergé 11 ans. Code couleur :

α-Proteobacteria	Actinobacteria	Bacilli
Clostridia	Flavobacteria	Fusobacteria

Au sein de la couche B, les *α-Proteobacteria* sont moins prédominantes et ne représentent plus que 3 souches sur 11. On remarque l'apparition de trois espèces de *Bacilli*, classe non représentée dans la couche A. Il s'agit de souches proches de *Bacillus licheniformis* dont le métabolisme possède la capacité d'oxyder le thiosulfate, les sulfures ainsi que les sulfites [29]. Cette espèce peut donc être considérée comme une BSO. D'autre part, on remarque de nouveau la présence d'une espèce de *Clostridia* et d'une espèce de *Fusobacteria*, deux classes non représentées aux temps d'immersion courts.

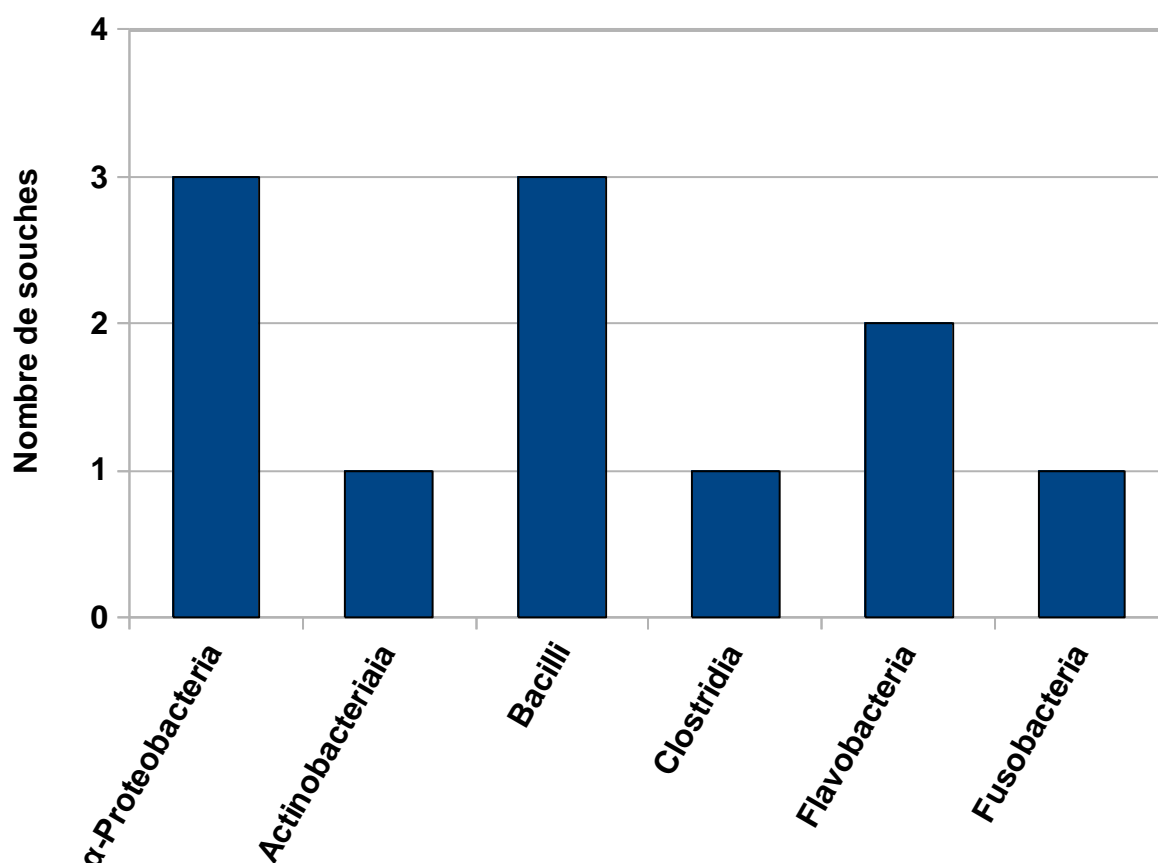


Figure 5.15 : Répartition par classe des souches caractérisées issues de la strate B du coupon immergé 11 ans.

II.2.2.2. Conclusion

L'identification des souches cultivables a mis en évidence la présence de 8 classes : *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Clostridia*, *Flavobacteria*, *Fusobacteria*, α -*Proteobacteria*, δ -*Proteobacteria* et γ -*Proteobacteria*. La répartition des classes bactériennes dépend de la strate considérée. Au sein de la strate A la plus externe, on identifie une espèce de δ -*Proteobacteria* et une de γ -*Proteobacteria* qui ne sont pas présentes dans la couche B. Rappelons qu'une majorité de BSR se rattache à la classe des δ -*Proteobacteria*, et l'espèce identifiée ici est effectivement une BSR du genre *Desulfovibrio*. Au sein de la couche B, on identifie une bactérie de la classe *Actinobacteria* ainsi que 3 espèces de *Bacilli*, non observées dans la strate M. Ces deux couches constituent donc bien deux environnements distincts. Cependant, la classe des α -*Proteobacteria* apparaît comme fortement représentée au sein de la

flore cultivable des 2 couches (mais surtout dans la couche A).

D'autre part, si l'on compare ces résultats à ceux obtenus dans le chapitre 4, on peut constater l'apparition des classes *Clostridia*, *Fusobacteria* et *δ -Proteobacteria* qui n'étaient pas présentes au sein de la flore cultivable même après 2 mois d'immersion. La flore cultivable se serait étoffée suite à la modification du milieu.

Cette diversité est observée sur une fraction cultivable qui ne représente que 0,05 et 0,0002 % de la totalité des espèces. Ceci laisse penser que la diversité de l'ensemble de la biomasse est très importante. Cependant, l'analyse moléculaire de la biomasse totale est indispensable afin de ne pas se limiter à une fraction minoritaire de la communauté bactérienne présente.

II.2.3 Diversité de la flore bactérienne totale

L'analyse par TTGE a été utilisée sur les échantillons de biofilm composite afin de séparer les espèces bactériennes majoritaires présentes dans chaque strate, en fonction de la composition en bases d'un fragment polymorphe de l'ADNr16S. La figure 5.16 représente le profil obtenu pour les strates A et B. La strate C n'a pas pu être étudiée car il a été impossible d'obtenir de l'ADN à partir de cet échantillon, malgré plusieurs tentatives.

Les profils obtenus en TTGE mettent en évidence une grande diversité bactérienne au sein de l'échantillon immergé durant 11 ans. En effet, le nombre total de bandes (21) à la fois sur la strate la plus externe A et la strate centrale épaisse B est supérieur à celui observé sur les coupons immergés entre 1 semaine et 2 mois. Bien que certaines de ces bandes soient présentes dans les deux strates de la couche composite « rouille/micro-organismes », notamment les couples 53/64, 54/66, 58/69 et 59/70 respectivement pour les couches A et B, la majorité des bandes observées pour chaque strate n'est pas présente ou est peu représentée au niveau de l'autre strate. Par conséquent, il est clair que les bactéries majoritaires sont différentes selon les strates.

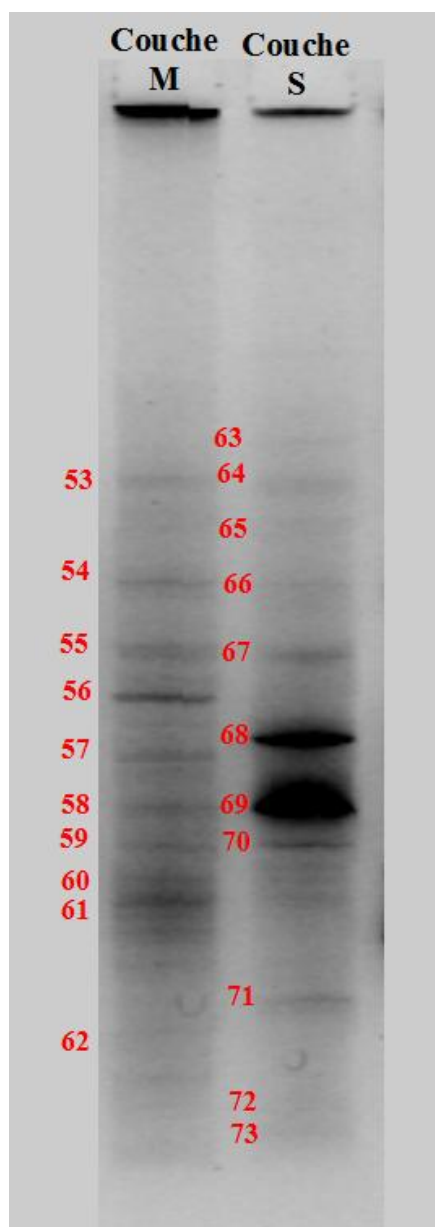


Figure 5.16 : Analyse par TTGE de la diversité bactérienne de la microflore bactérienne totale du coupon analysé après 11 ans d’immersion.

Le séquençage de l’ADN de chacune des bandes effectué sur ces échantillons n’a pas permis d’identifier les souches. En effet, les quantités d’ADN extrait ou leur qualité n’ont pas pu aboutir à leur caractérisation. Ceci illustre une nouvelle fois les difficultés inhérentes au type d’objet étudié.

L’analyse en densitométrie nous a permis de déterminer la représentativité relative de chaque bande par rapport au total des bandes de chaque échantillon. Dans la strate M, on peut

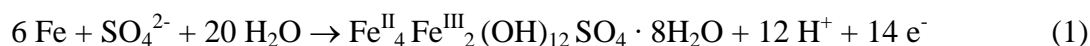
noter qu'une espèce semble majoritaire, à savoir la 61, avec une proportion de 23 %. Dans la strate S, ce sont les espèces 68 (26%) et 69 (58%) qui sont significativement majoritaires. Les autres espèces sont très minoritaires.

III. Discussion.

III.1. Thermodynamique

Les expériences électrochimiques menées en laboratoire ont donc confirmé que la rouille verte sulfatée pouvait continuer à se former quand la surface de l'acier se trouvait en conditions anoxiques ou proches de l'anoxie. Comme la magnétite Fe_3O_4 , la rouille verte est un composé à valence mixte Fe(II,III) qui peut être obtenue par oxydation d'un précurseur à base de Fe(II) tel que Fe(OH)_2 en milieu aéré. Nous n'avons cependant pas observé un tel précurseur et la possibilité qu'il s'oxyde en rouille verte en l'absence d'oxygène reste à démontrer.

Cependant, une polarisation anodique peut produire des espèces Fe(II) et des espèces Fe(III) , ce qui conduit alors directement du métal à la rouille verte selon la réaction suivante :



Au potentiel d'abandon, lorsque le métal se corrode en conditions anoxiques, cette réaction d'oxydation est nécessairement accompagnée par la réduction de l'eau (H_2O ou H^+) :



Les conditions d'équilibre entre le métal Fe et la rouille verte sont données par [30]:

$$E_{\text{eq}}(\text{RV}_{\text{SO}_4}/\text{Fe}) = -0,15 - 0,0507 \text{ pH} - 0,0042 \log(a_{\text{SO}_4}) \quad (3)$$

L'activité des ions SO_4^{2-} , a_{SO_4} , peut être estimée en utilisant le coefficient d'activité des ions sulfate dans l'eau de mer [31], qui est $\gamma_{\text{SO}_4} = 0,12$.

Alors: $a_{\text{SO}_4} = \gamma_{\text{SO}_4} \times [\text{SO}_4^{2-}] = 0,12 \times 0,03 = 0,0036$ puisque la concentration en sulfate de

l'électrolyte vaut $0,03 \text{ mol L}^{-1}$. Le pH étant égal à 7,95, le potentiel d'équilibre s'établit à :

$$E_{\text{eq}}(\text{RV}_{\text{SO}_4}/\text{Fe}) = -0,54 \text{ V/ESH}$$

Cette valeur a été calculée avec les données relatives à l'eau de mer simplifiée utilisée dans notre travail mais elle ne diffère pas beaucoup de celle que l'on obtiendrait avec l'eau de mer naturelle. Elle doit maintenant être comparée au potentiel d'équilibre du couple H_2O (ou H^+/H_2), donné par :

$$E_{\text{eq}}(\text{H}^+/\text{H}_2) = 0,00 - 0,0591 \text{ pH} \quad (4)$$

Pour une valeur de pH de 7,95, cette équation donne $E_{\text{eq}}(\text{H}^+/\text{H}_2) = -0,47 \text{ V/ESH}$.

Ainsi : $E_{\text{eq}}(\text{RV}_{\text{SO}_4}/\text{Fe}) < E_{\text{eq}}(\text{H}^+/\text{H}_2)$. Ceci démontre que la formation de $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$ par corrosion de l'acier dans de l'eau de mer est en effet thermodynamiquement possible en l'absence d'oxygène dissous, c'est-à-dire avec l'eau comme seul agent oxydant. Il est intéressant de noter que les valeurs le potentiel d'abandon E_{ab} ont été mesurées à environ $-0,75 \text{ V/ECS}$, c'est-à-dire $-0,51 \text{ V/ESH}$, de sorte que l'on a bien :

$$E_{\text{eq}}(\text{RV}_{\text{SO}_4}/\text{Fe}) < E_{\text{ab}} < E_{\text{eq}}(\text{H}^+/\text{H}_2)$$

La magnétite Fe_3O_4 peut également se former en l'absence d'oxygène. Les conditions d'équilibre entre le métal Fe et Fe_3O_4 sont telles que [30,32]:

$$E_{\text{eq}}(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Fe}) = -0,086 - 0,0591 \text{ pH} \quad (5)$$

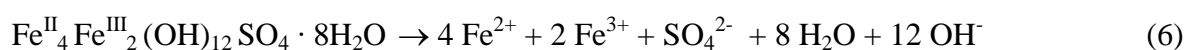
On obtient ainsi $E_{\text{eq}}(\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Fe}) = -0,55 \text{ V/ESH}$ à $\text{pH} = 7,95$. En principe, puisque cette valeur est plus faible que celle de $E_{\text{eq}}(\text{RV}_{\text{SO}_4}/\text{Fe})$, $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$ est métastable dans l'eau de mer vis-à-vis de la magnétite. Cependant, la différence entre les deux potentiels d'équilibre, environ 10 mV , est très faible.

III.2. Mécanismes

Une fois que des conditions anoxiques sont établies à la surface de l'acier en eau de mer naturelle, la formation de $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$ entre en compétition non seulement avec celle de la magnétite, mais également avec celle de FeS . La formation de sulfures de fer est bien entendu

clairement liée à l'activité métabolique des BSR, qui réduit les sulfates nécessaires à la formation de $RV(SO_4^{2-})$, pour produire les sulfures nécessaires à la formation de FeS.

La formation de la magnétite peut provenir d'un processus abiotique mais pourrait aussi résulter de l'influence de micro-organismes. En effet, les BSR consomment les ions sulfates et peuvent de ce fait induire une transformation de $RV(SO_4^{2-})$, comme montré au chapitre 3 (et références [33,34]). Cette consommation d'ions sulfate induit d'abord une dissolution progressive de la rouille verte :



Comme mentionné au chapitre 3, un ion sulfate ainsi relâché en solution va permettre la formation d'un ion sulfure et la précipitation d'un ion Fe^{2+} sous forme de FeS. Ce processus laisse 3 ions Fe^{2+} et 2 ions Fe^{3+} en solution, à partir desquels la magnétite pourrait effectivement se former. Cette hypothèse permet d'expliquer la présence conjointe des 3 phases dans la couche de rouille du coupon immergé durant 11 ans.

Bien entendu, la magnétite pourrait également résulter, comme $RV(SO_4^{2-})$, de la corrosion de l'acier. Les principaux paramètres qui vont alors gouverner les mécanismes de formation compétitifs de $RV(SO_4^{2-})$ et Fe_3O_4 sont le pH et les concentrations en Fe^{2+} et SO_4^{2-} à la surface du métal [30]. Bien entendu, plus la concentration en sulfate sera faible, plus la tendance à former Fe_3O_4 au détriment de $RV(SO_4^{2-})$ sera forte. Mais des pH élevés et des concentrations faibles en fer dissous favorisent également la magnétite [30]. Ainsi, des variations locales de ces trois paramètres peuvent aussi expliquer la variabilité des produits de corrosion. La principale source de telles hétérogénéités est d'origine biologique. Ces hétérogénéités « biologiques » se traduisent parfois par des hétérogénéités électrochimiques, c'est-à-dire par la présence de zones cathodiques et anodiques à la surface de l'acier.

D'une manière générale, il est important de remarquer que la transformation des phases présentes dans la rouille peut toujours être induite par des micro-organismes. Les bactéries ferri-réductrices (BFR) sont ainsi susceptibles de réduire les composés de Fe(III) en composés de Fe(II) ou en composés à valence mixte Fe(II-III). Il a été par exemple démontré récemment que l'association de BSR et de BFR favorisait la formation de $RV(SO_4^{2-})$ au détriment de celle de FeS [35]. D'autre part, certains micro-organismes sont capables d'échanger des électrons directement avec la surface de l'acier [36,37], ou, par l'action d'une hydrogénase adsorbée à la surface du métal, de catalyser la réduction du proton [38-40]. Ces micro-organismes modifient donc la cinétique des réactions anodique et/ou cathodique et

peuvent influencer indirectement sur la nature des produits de corrosion formés. On notera cependant que la rouille verte sulfatée se forme également sur l'acier placé sous protection cathodique, à des potentiels de -1,0 V/ECS [41]. Si l'on considère les résultats obtenus ici en polarisation anodique, on peut en conclure que $RV(SO_4^{2-})$ se forme en milieu marin sur un large domaine de potentiel, c'est-à-dire indépendamment de la cinétique des réactions anodique et cathodique.

Les analyses microbiologiques ont permis de mettre en évidence que la concentration bactérienne totale était notablement plus élevée dans les strates externes et intermédiaires du coupon immergé durant 11 ans que dans les couches composites « rouille/ biofilm » formées après des temps d'immersion courts (≤ 2 mois). La population bactérienne continue donc à se développer au sein de ces couches. De plus, la population cultivable a elle aussi augmenté et on peut constater qu'au sein de la couche la plus externe la population bactérienne cultivable est majoritairement composée de souches aérobies. Au sein de la couche intermédiaire, la population bactérienne qui a été isolée est presque également répartie entre micro-organismes aérobies et anaérobies, ce qui est à relier au gradient d'oxygène induit notamment par la respiration des organismes aérobies. En revanche, la couche interne a révélé que la population bactérienne était très restreinte, inférieure au seuil de détection des méthodes d'analyses utilisées. Cela explique que nous n'ayons pas réussi à extraire de l'ADN à partir de cet échantillon. Cette zone apparaît donc comme très sélective, en raison probablement des conditions plus extrêmes qui la caractérise, notamment une absence quasi-totale d'oxygène et des concentrations élevées en fer et espèces soufrées. De plus, l'apport en nutriments provenant de l'environnement extérieur doit être extrêmement restreint car ceux-ci sont probablement consommés au sein des couches externes et intermédiaires.

On a d'autre part pu constater que la fraction cultivable devenait très faible sur cet échantillon, entre 2.10^{-4} % et 5.10^{-4} %, excepté en aérobiose sur la couche la plus externe (0,05 %).

Enfin, nous avons noté que la flore bactérienne s'était diversifiée au cours du temps puisque certaines bactéries cultivables, appartenant à des classes qui n'étaient pas détectées aux temps d'immersion courts (≤ 2 mois), ont pu être mise en évidence dans la couche composite « rouille/micro-organismes » après 11 ans. Il s'agit notamment des classes *Fusobacteria*, *Clostridia* et δ -*Proteobacteria*, les deux dernières incluant la plupart des bactéries sulfurogènes (principalement les BSR) et aussi des bactéries impliquées dans le cycle du fer. Nous avons ainsi identifié, au sein de la strate la plus externe, une souche

cultivable de *δ-Proteobacteria* appartenant au genre *Desulfovibrio*, définie comme sulfato-réductrice.

En conclusion, les analyses microbiologiques confortent les hypothèses déduites des analyses physico-chimiques. La présence d'une strate interne très fine constituée uniquement de $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$ et Fe_3O_4 semblait indiquer que l'influence directe des bactéries sulfurogènes sur le processus de corrosion avait décru, puisque la concentration en espèces sulfures à proximité de la surface de l'acier était devenue insuffisante pour permettre la formation de FeS . En corrélation, la concentration en bactéries dans les strates internes de la couche composite « rouille/micro-organismes » s'est avérée particulièrement faible. Autre fait cohérent avec cette analyse, la seule espèce cultivable de BSR identifiée l'a été dans la strate externe. Ceci confirme la nécessité, pour les espèces bactériennes, de quitter la proximité de la surface de l'acier pour s'approcher du milieu extérieur, source de nutriments. A ces stades très avancés de la corrosion des aciers en milieu marin, de nouveaux mécanismes se mettent donc en place. L'influence des métabolismes bactériens et de leurs interactions avec les cycles redox du fer et du soufre, toujours actifs dans les strates externes de la couche composite « rouille/micro-organismes », tendrait peut-être à s'amoindrir. Il serait alors intéressant de voir, sur des échantillons un peu plus anciens, si la phase $\beta\text{-Fe}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ majoritairement observée sur les lingots gallo-romains des Saintes-Maries de la Mer [25], pourrait être détectée sur des objets contemporains.

Références :

- [1] S. Pineau, Thèse, Université de Technologie de Compiègne (2006).
- [2] S. Pineau, R. Sabot, L. Quillet, M. Jeannin, Ch. Caplat, I. Dupont-Morrall, Ph. Refait, *Formation of the Fe(II-III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel associated to molecular detection of dissimilatory sulphite-reductase*, Corros. Sci. **50** (2008) p. 1099-1111.
- [3] R. E. Melchers, R. Jeffrey, *Early corrosion of mild steel in seawater*, Corros. Sci. **47** (2005) p. 1678-1693.
- [4] R. E. Melchers, T. Wells, *Models for the anaerobic phases of marine immersion corrosion*, Corros. Sci. **48** (2006) p. 1791-1811.
- [5] R. E. Melchers, *Modelling of marine immersion corrosion for mild and low alloy steels –*

*Part 1: Phenomenological model, Corrosion (NACE) **59** (2003) p. 319-334.*

[6] R.E. Melchers, *Mathematical modelling of the diffusion controlled phase in marine immersion corrosion of mild steel*, Corros. Sci. **45** (2003) p. 923-940.

[7] L. Legrand, S. Savoye, A. Chausse, R. Messina, *Study of oxidation products formed on iron in solutions containing bicarbonate/carbonate*, Electrochim. Acta **46** (2000) p. 111–117.

[8] S. Savoye, L. Legrand, G. Sagon, S. Lecomte, A. Chausse, R. Messina, P. Toulhoat, *Experimental investigations on iron corrosion products formed in bicarbonate/carbonate-containing solutions at 90°C*, Corros. Sci. **43** (2001) p. 2049 – 2064.

[9] L. Legrand, M. Abdelmoula, A. Géhin, A. Chaussé, J.-M.R. Génin, *Electrochemical formation of a new Fe(II)-Fe(III) hydroxy-carbonate green rust: characterisation and morphology*, Electrochim. Acta **46** (2001) p. 1815–1822.

[10] Ph. Refait, D. D. Nguyen, M. Jeannin, S. Sablé, M. Langumier, R. Sabot, *Electrochemical formation of green rusts in deaerated seawater-like solutions*, Electrochim. Acta, **56** (2011) p. 6481-6488.

[11] J.P. Riley, G. Skirrow, Eds, *Chemical Oceanography*, Vol. 2, 2nd ed., Academic Press, 1975.

[12] J.B. Memet, Thèse, Université de La Rochelle (2000).

[13] N. Boucherit, A. Hugot-Le Goff, S. Joiret, *Raman studies of corrosion films grown on Fe and Fe-Mo in pitting conditions*, Corros. Sci. **32** (1991) p. 497-507.

[14] L. Legrand, G. Sagon, S. Lecomte, A. Chaussé, R. Messina, *A Raman and infrared study of a new carbonate green rust obtained by electrochemical way*, Corros. Sci. **43** (2001) p. 1739-1749.

[15] M. Reffass, R. Sabot, C. Savall, M. Jeannin, J. Creus, Ph. Refait, *Localised corrosion of carbon steel in NaHCO₃/NaCl electrolytes: role of Fe(II)-containing compounds*, Corros. Sci. **48** (2006) p. 709-726.

[16] R. Sabot, M. Jeannin, M. Gadouleau, Q. Guo, E. Sicre, Ph. Refait, *Influence of lactate ions on the formation of rust*, Corros. Sci. **49** (2007) p. 1610-1624

[17] Ph. Refait, P. Girault, M. Jeannin, J. Rose, *Influence of arsenate species on the formation of Fe(III) oxyhydroxides from Fe(II)*, Colloids and Surfaces A **332** (2009) p. 26-35.

[18] Ph. Refait, M. Reffass, J. Landoulsi, R. Sabot, M. Jeannin, *Role of phosphate species during the formation and transformation of the Fe(II-III) hydroxycarbonate Green Rust*, Colloids and Surfaces A **299** (2007) p. 29-37.

[19] L. Simon, M. François, Ph. Refait, G. Renaudin, M. Lelaurain, J.M.R. Génin, *Structure of the Fe(II-III) layered double hydroxysulphate green rust two from Rietveld analysis*, Solid

State Sci. **5** (2003) p. 327-334.

[20] A. Géhin, C. Ruby, M. Abdelmoula, O. Benali, J. Ghanbaja, Ph. Refait, J.-M. R. Génin, *Synthesis by coprecipitation of Fe(II)-Fe(III) hydroxysulphate green rust, characterisation and morphology*, Solid State Sci. **4** (2002) p. 61-66.

[21] Ph. Refait, J.-B. Memet, C. Bon, R. Sabot, J.-M. R. Génin, *Formation of the Fe(II)-Fe(III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel*, Corros. Sci. **45** (2003) p. 833-845.

[22] S. Miyata, *Anion-exchange properties of hydrotalcite-like compounds*, Clays Clay Miner. **31** (1983) p. 305-311.

[23] A. Mendiboure, R. Schöllhorn, *Formation and anion exchange reactions of layered transition metal hydroxides $[Ni_{1-x}Mx](OH)_2(CO_3)_{x/2}(H_2O)_z$ ($M=Fe,Co$)*, Rev. Chim. Miner. **23** (1986) p. 819-827.

[24] Ph. Refait, S.H. Drissi, J. Pytkiewicz, J.M. Génin, *The anionic species competition in iron aqueous corrosion : role of various green rust compounds*, Corros. Sci. **39** (1997) p. 1699-1710.

[25] C. Rémazeilles, D. Neff, F. Kergourlay, E. Foy, E. Conforto, E. Guilminot, S. Reguer, Ph. Refait, Ph. Dillmann, *Mechanisms of long-term anaerobic corrosion of iron archaeological artefacts in seawater*, Corros. Sci. **51** (2009) p. 2932-2941.

[26] I.V. Pekov, N. Perchiazzi, S. Merlino, V.N. Kalachev, M. Merlini, A.E. Zadov, *Chukanovite, $Fe_2(CO_3)(OH)_2$, a new mineral from the weathered iron meteorite Dronino*, Eur. J Mineralogy **19** (2007) p. 891-898.

[27] C. Rémazeilles, Ph. Refait, *Fe(II) hydroxycarbonate $Fe_2(OH)_2CO_3$ (Chukanovite) as iron corrosion product: Synthesis and study by Fourier Transform Infrared Spectroscopy*, Polyhedron, **28** (2009) p. 749-756.

[28] P. Lebaron, P. Servais, M. Trousselier, C. Courties, G. Muyzer, L. Bernard, H. Schäfer, R. Pukall, E. Stackebrandt, T. Guindulain, J. Vives-Rego, *Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms : changes in abundances, activity and composition*, FEMS microbiology ecology (2001) p. 255-266.

[29] M. I. Vitols, R. J. Swaby, *Activity of sulphur-oxidizing micro-organisms in some Australian soils*, Australian journal of Soil Research **7** (1969) p. 171-183.

[30] Ph. Refait, A. Géhin, M. Abdelmoula et J.-M. R. Génin, *Coprecipitation thermodynamics of iron(II-III) hydroxysulphate green rust from Fe(II) and Fe(III) salts*, Corros. Sci. **45** (2003) p. 656-676.

[31] R.M. Garrels, C.L. Christ. *Equilibres des minéraux et de leurs solutions aqueuses*,

Gauthiers-Villars, Paris (1967).

[32] G. H. Kelsall, R. A. Williams, *Electrochemical behaviour of ferrosilicides (Fe_xSi) in neutral and alkaline aqueous electrolytes*, J. Electrochem. Soc. **138** (1991) p. 931.

[33] A. Zegeye, L. Huguet, M. Abdelmoula, C. Carteret, M. Mullet, F. Jorand, *Biogenic hydroxysulfate green rust, a potential electron acceptor for SRB activity*, Geochim. Cosmochim. Acta **71** (2007) p. 5450-5462.

[34] M. Langumier, R. Sabot, R. Obame-Ndong, M. Jeannin, S. Sablé, Ph. Refait, *Formation of Fe(III)-containing mackinawite from hydroxysulphate green rust by sulphate reducing bacteria*, Corros. Sci. **51** (2009) p. 2694-2702.

[35] J. Duan, S. Wu, X. Zhang, G. Huang, M. Du, B. Hou, *Corrosion of carbon steel influenced by anaerobic biofilm in natural seawater*, Electrochim. Acta **54** (2008) p. 22-28.

[36] M. Mehanna, R. Basseguy, M.-L. Delia, A. Bergel, *Role of direct microbial electron transfer in corrosion of steels*, Electrochem. Commun. **11** (2009) p. 568-571.

[37] M. Mehanna, R. Basseguy, M.-L. Delia, A. Bergel, *Effect of Geobacter sulfurreducens on the microbial corrosion of mild steel, ferritic and austenitic stainless steels*, Corros. Sci. **51** (2009) p. 2596-2604.

[38] R.D. Bryant, W.J. Jansen, J. Boivin, E.J. Laishley, W. Costerton, *Effect of hydrogenase and mixed sulfate-reducing bacterial populations on the corrosion of steel*, Appl. Environ. Microbiol. **57** (1991) p. 2804-2809.

[39] S. Da Silva, R. Basseguy, A. Bergel, *The role of hydrogenases in the anaerobic microbiologically influenced corrosion of steels*, Bioelectrochem. **56** (2002) p. 77-79.

[40] M. Mehanna, R. Basseguy, M.-L. Delia, L. Girbal, M. Demuez, A. Bergel, *New hypotheses for hydrogenase implication in the corrosion of mild steel*, Electrochim. Acta **54** (2008) p. 140-147.

[41] Ch. Barchiche, C. Deslouis, O. Gil, S. Joiret, Ph. Refait, B. Tribollet, *Role of sulphate ions on the formation of calcareous deposits on steel in artificial seawater: the formation of Green Rust compounds during cathodic protection*, Electrochim. Acta, **54** (2009) p. 3580-3588.

Conclusions et perspectives

Ces travaux de thèse ont fait suite aux dernières études effectuées dans le domaine de la corrosion induite par les micro-organismes des aciers en milieu marin, et se sont donc notamment appuyés sur les méthodologies développées (et sur les résultats afférents) par les thèses de Samuel Pineau [1,2] et Asfaw Zegeye [3,4]. Ainsi avons-nous appliqué des techniques de biologie moléculaire à des couches de produits de corrosion et développé des systèmes modèles pour étudier en détail certains aspects particuliers des interactions entre la physico-chimie du fer en milieu marin et le métabolisme bactérien. En effet, la couche de rouille, de par son importante porosité, constitue une zone particulière où les produits de la corrosion des aciers, et notamment la rouille verte sulfatée $RV(SO_4^{2-})$, coexistent avec des micro-organismes provenant du milieu extérieur. La corrosion des aciers en milieu marin implique donc différentes interactions entre les phénomènes d'oxydoréduction du fer et ceux du soufre - éléments impliqués dans la formation de $RV(SO_4^{2-})$ - via l'activité métabolique des micro-organismes. Le mécanisme général est donc, par essence, un processus influencé par les bactéries.

Le principal objectif de notre thèse était donc d'améliorer la compréhension des interactions entre la physico-chimie du fer et les métabolismes bactériens existant au sein du système « rouille-biofilm » pour en déduire leur impact potentiel sur les processus de corrosion de l'acier. Pour ce faire, nous avons dans la première partie de notre travail étudié de façon détaillée les interactions entre BSR et $RV(SO_4^{2-})$, à l'instar de la première (et unique) étude réalisée à ce sujet [3,4]. Pour la nouvelle étude présentée ici, nous avons souhaité travailler dans des conditions différentes, notamment avec $RV(SO_4^{2-})$ comme unique solide à base de fer et avec une espèce bactérienne (*Desulfovibrio desulfuricans* subsp. *aestuarii*) ne réalisant pas une oxydation complète du substrat carboné jusqu'au CO_2 . D'autre part, nous avons fait varier la concentration en bactéries afin de nous rapprocher des conditions réelles de corrosion marine.

Nous avons ainsi confirmé que la rouille verte sulfatée pouvait constituer une source de sulfates pour alimenter la respiration anaérobie des bactéries sulfato-réductrices, validant ainsi les travaux antérieurs [3,4]. Mais nous avons en plus démontré que les bactéries pouvaient se développer, c'est-à-dire que la concentration bactérienne pouvait augmenter, alors que la principale source de sulfates était la rouille verte sulfatée. Ces résultats sont à mettre en regard de l'association rouille verte sulfatée / bactéries sulfato-réductrices / sulfures

de fer systématiquement observée au sein des couches de rouille sur des coupons métalliques immergés eau de mer sur différents sites portuaires [1,2]. Ils montrent en effet que l'accumulation de rouille verte sulfatée, résultat des processus électrochimiques de la corrosion de l'acier dans l'eau de mer, permet de constituer un réservoir de sulfates pour les BSR qui, ultérieurement, viendront coloniser les zones internes de la couche de rouille. De ce fait, le développement des BSR et donc la formation d'espèces sulfures seront favorisés.

Lorsque les BSR se développent, la rouille verte se dissout progressivement. Dans les conditions les plus favorables au développement des BSR considérées dans notre étude, c'est-à-dire lorsque du dioxyde de carbone et des sulfates dissous étaient présents, l'activité métabolique des bactéries sulfato-réductrices a conduit à la transformation totale de la rouille verte en mackinawite et sidérite.

Pour en terminer avec ce système modèle, notons que dans les travaux antérieurs [3,4], la greigite était le seul sulfure de fer bio-généré par la transformation de la rouille verte sulfatée. Avec les conditions expérimentales utilisées dans notre étude, la mackinawite a été le minéral produit à partir de la rouille verte, comme observé sur sites [1,2]. Cette mackinawite contenait cependant du Fe(III). La formation de cette mackinawite partiellement oxydée semble en tout cas témoigner de la bioréduction de la rouille verte sulfatée par les bactéries sulfato-réductrices. En effet, les cations Fe(III) que contient ce composé proviennent de la dissolution de la rouille verte induite par la consommation des sulfates par les BSR.

Nous avons dans un deuxième temps placé des coupons d'acier en immersion constante sur la plate-forme expérimentale dont dispose le LEMMA sur le site du port des Minimes de La Rochelle. L'objectif était de caractériser aux temps courts (1 semaine à 2 mois) le développement de la couche « rouille-biofilm » en couplant analyses physico-chimiques et microbiologiques.

Les analyses par spectroscopie Raman ont permis de déterminer la nature des produits de corrosion formés après 1 semaine à 2 mois d'exposition au milieu marin. Il s'agit de la rouille verte sulfatée et des produits de son oxydation par le dioxygène dissous, à savoir la lépidocrocite, la goethite et la magnétite. Cependant, des sulfures de fer ont pu être détectés localement au sein d'une couche interne de produit de corrosion sur l'échantillon immergé 1 mois.

Cette étude conforte le mécanisme de la corrosion « abiotique » d'acier en eau de mer proposé préalablement [1,2]. Dans cette phase du processus, la cinétique est contrôlée par la réaction cathodique de réduction de O_2 dissous, et donc, lorsque la couche de rouille est

suffisamment épaisse, par la diffusion de O_2 au travers de cette couche. Les réactions cathodiques et anodiques ont lieu sur toute la surface et conduisent en premier lieu à la formation de la rouille verte sulfatée. $RV(SO_4^{2-})$ est ensuite oxydée en lépidocrocite, goethite, ou magnétite en fonction de différents paramètres et notamment du flux d'oxygène, de la température et de la concentration en $Fe(II)$ dissous.

En parallèle, un biofilm microbien se développe et la couche de rouille se recouvre d'un film de substances organiques (comprenant notamment des micro-organismes) ainsi que de substances minérales issues de l'eau de mer. La diffusion de l'oxygène dissous dans l'eau de mer jusqu'à la surface du métal est donc limitée. De plus, l'activité biologique au sein du biofilm et dans la partie externe des produits de corrosion peut consommer une forte proportion de cet oxygène, ce qui conduit à des conditions d'anaérobiose dans la partie interne de la couche de rouille. Ce microenvironnement limite l'oxydation de la rouille verte sulfatée et mène donc à l'accumulation de ce produit en surface du coupon. Les zones internes se retrouvent dans des conditions anoxiques favorables au développement de bactéries sulfurogènes et notamment de BSR. A partir de là, la concentration en espèces sulfures augmente à proximité de la surface du métal, conduisant à la précipitation de mackinawite nanocristalline. Le processus de corrosion change donc : il est maintenant influencé par les BSR.

Cependant, après 1 à 2 mois d'immersion, la présence de FeS reste marginale. Sur les coupons correspondants, nous n'avons détecté qu'une seule fois, très localement, la mackinawite nanocristalline. Ceci indique que ces durées d'exposition sont encore insuffisantes pour que les conditions propices à la colonisation de la couche de rouille par une microflore anaérobie spécifique aient été réunies. En particulier, une épaisseur minimale doit être atteinte avant que la quasi-totalité de l'oxygène dissous en provenance du milieu soit intégralement consommée par les micro-organismes aérobies et par l'oxydation de la rouille verte sulfatée.

L'analyse microbiologique a confirmé la grande diversité d'espèces bactériennes de la microflore associée aux biofilms composites « micro-organismes / produits de corrosion » formés en environnement portuaire, déjà mise en évidence par S. Pineau [3]. Plus précisément, les différents résultats obtenus semblent indiquer que les bactéries associées aux cycles du fer et du soufre sont favorisées par le développement de la couche de produits de corrosion. Différents micro-organismes associés au soufre ou au fer ont ainsi été identifiés sur les coupons immergés pendant un ou deux mois. Il s'agit notamment de bactéries micro-aérobies sulfurogènes du genre *Sulfurospirillum* ou de l'espèce *Desulfitispora alkaliphilum*, micro-

organismes pouvant utiliser le soufre élémentaire, les thiosulfates et les sulfites (mais pas les sulfates), comme accepteurs d'électrons. D'autre part, des micro-organismes du genre *Sulfitobacter* ou *sulfurimonas*, susceptibles d'oxyder les sulfites et parfois les thiosulfates, et du genre *Marinobacter*, susceptibles d'oxyder Fe(II) en Fe(III), ont été identifiés. De même, une espèce ferri-réductrice a pu être mise en évidence sur le coupon immergé deux mois.

En outre, des BSR du genre *Desulfovibrio*, ont pu être identifiées sur l'échantillon immergé 1 mois, après enrichissement de la microflore bactérienne cultivable. Ce résultat est à mettre en parallèle avec l'observation de FeS grâce à la μ -spectroscopie Raman. Il laisse à penser que certaines conditions ont permis aux BSR de coloniser une zone bien particulière du coupon immergé un mois. Il s'agit probablement de la zone où des sulfures de fer ont été identifiés localement. Dans cette zone particulière, des conditions anaérobies ont dû s'établir précocement au sein de la couche composite biofilm / produits de corrosion, que l'on sait très hétérogène par nature.

Par comparaison avec les résultats antérieurs [1,2], il semble donc que le système de corrosion bascule du processus « abiotique » au processus influencé par les BSR entre le 2^{ème} et le 6^{ème} mois d'immersion. Néanmoins, selon Melchers et Jeffrey [5], la transition entre la première phase, aérobie, et la seconde phase, anaérobie, du processus a lieu au bout d'un temps t_a qui dépend notamment de la température de l'eau. Dans ce modèle, t_a vaut 6-12 mois pour des températures de 20 à 30°C et peut aller jusqu'à 3 ans pour des températures de 10 à 15°C. Cette période de transition devra être tout particulièrement étudiée dans des travaux futurs. L'évolution des zones très locales où se développent des bactéries sulfurogènes, telle que celle observée sur le coupon immergé un mois via la présence de FeS, devrait notamment fournir des informations sur la genèse des cas de dégradation accélérée imputés aux bactéries sulfurogènes.

Rappelons pour conclure l'abondance, observée après 1 à 2 mois d'immersion, des bactéries associées aux cycles du fer et du soufre, conséquence de l'environnement particulier que constitue la couche de rouille. Ceci montre que même si le processus de corrosion n'est pas encore clairement influencé par les bactéries, les conditions propices à cette influence sont déjà établies.

Enfin, le dernier volet de cette thèse a concerné le comportement du système lorsque la surface de l'acier et les strates internes de la couche « rouille-biofilm » se retrouvent placées en conditions anoxiques, ce qui correspond à des durées d'immersion supérieures à 1 an. Pour ce faire nous avons, d'une part, mené à bien une étude électrochimique du

comportement d'électrodes d'acier dans des électrolytes désaérés simulant l'eau de mer. En parallèle, nous avons d'autre part caractérisé des coupons immergés continûment dans l'eau de mer pendant 11 ans, en couplant toujours analyses physico-chimiques et analyses microbiologiques.

Les expériences électrochimiques ont permis de démontrer que la rouille verte sulfatée pouvait continuer à se former quand la surface de l'acier se trouvait en conditions anoxiques ou proches de l'anoxie. Comme la magnétite Fe_3O_4 , la rouille verte est un composé à valence mixte Fe(II,III) qui peut être obtenue par oxydation d'un précurseur à base de Fe(II) tel que Fe(OH)_2 en milieu aéré. Nous n'avons cependant pas observé un tel précurseur et la possibilité qu'il s'oxyde en rouille verte en l'absence d'oxygène reste à démontrer.

Les analyses physico-chimiques du coupon immergé 11 ans ont montré que l'épaisse couche de rouille (7-8 mm) était essentiellement constituée de 3 phases, la rouille verte, la mackinawite et la magnétite. Ce sont les trois phases susceptibles de se former en conditions anoxiques. $\text{RV(SO}_4^{2-})$ est en principe la phase devant se former, comme nous l'avons démontré, dans l'eau de mer si aucune modification du milieu n'est survenue. Mais une fois que des conditions anoxiques sont établies à la surface de l'acier en eau de mer naturelle, la formation de $\text{RV(SO}_4^{2-})$ va entrer en compétition avec celle de la magnétite et celle de la mackinawite FeS , car le développement des BSR modifie le milieu. La formation de sulfures de fer est bien entendu clairement liée à l'activité métabolique des BSR, qui réduit les sulfates nécessaires à la formation de $\text{RV(SO}_4^{2-})$, pour produire les sulfures nécessaires à la formation de FeS . Mais en outre, plus la concentration en sulfate sera faible, plus la tendance à former Fe_3O_4 au détriment de $\text{RV(SO}_4^{2-})$ sera forte. Par ailleurs des pH élevés et des concentrations faibles en fer dissous favorisent également la magnétite. Ainsi, des variations locales de ces trois paramètres, $[\text{SO}_4^{2-}]$, pH et $[\text{Fe}^{2+}_{\text{aq}}]$, peuvent expliquer la variabilité des produits de corrosion. La principale source de telles hétérogénéités est d'origine biologique. Ces hétérogénéités « biologiques » se traduisent parfois par des hétérogénéités électrochimiques, c'est-à-dire par la présence de zones cathodiques et anodiques à la surface de l'acier.

Enfin, dans une très fine (épaisseur $\sim < 100 \mu\text{m}$) strate interne au contact du métal, nous n'avons détecté que la rouille verte et la magnétite. Les sulfures de fer ne semblent pas être présents au voisinage immédiat de l'acier.

Les analyses microbiologiques ont permis de mettre en évidence que la concentration bactérienne totale était notablement plus élevée dans les strates externes et intermédiaires du coupon immergé durant 11 ans que dans les couches composites « rouille/ biofilm » formées après des temps d'immersion courts (≤ 2 mois). La population bactérienne continue donc à se

développer au sein de ces couches. En outre, la flore bactérienne s'est diversifiée au cours du temps puisque certaines bactéries cultivables, appartenant à des classes qui n'étaient pas détectées aux temps d'immersion courts (≤ 2 mois), ont pu être mise en évidence dans la couche composite « rouille/micro-organismes » après 11 ans. Il s'agit notamment des classes *Fusobacteria*, *Clostridia* et δ -*Proteobacteria*, les deux dernières incluant la plupart des bactéries sulfurogènes (principalement les BSR) et aussi des bactéries impliquées dans le cycle du fer. Nous avons ainsi identifié, au sein de la strate la plus externe, une souche cultivable de δ -*Proteobacteria* appartenant au genre *Desulfovibrio*, définie comme sulfato-réductrice. En revanche, la population bactérienne des strates les plus internes de la couche composite « rouille/biofilm » s'est avérée très restreinte, inférieure au seuil de détection des méthodes d'analyses utilisées et nous n'avons pas réussi à en extraire de l'ADN. Cette zone apparaît donc comme très sélective, en raison probablement des conditions plus extrêmes qui la caractérise, notamment une absence quasi-totale d'oxygène et des concentrations élevées en fer et espèces soufrées. De plus, l'apport en nutriments provenant de l'environnement extérieur doit être extrêmement restreint car ceux-ci sont probablement consommés au sein des couches externes et intermédiaires.

Ainsi, les analyses microbiologiques confortent les hypothèses déduites des analyses physico-chimiques. La présence d'une strate interne très fine constituée uniquement de $\text{RV}(\text{SO}_4^{2-})$ et Fe_3O_4 confirme que l'influence directe des bactéries sulfurogènes sur le processus de corrosion a décru, puisque la concentration en espèces sulfures à proximité de la surface de l'acier est devenue insuffisante pour permettre la formation de FeS . Autre fait cohérent avec cette analyse, la seule espèce cultivable de BSR identifiée l'a été dans la strate externe. Ceci confirme la nécessité, pour les espèces bactériennes, de quitter la proximité de la surface de l'acier pour s'approcher du milieu extérieur, source de nutriments.

A ces stades très avancés de la corrosion des aciers en milieu marin, de nouveaux mécanismes se mettent donc en place. L'influence des métabolismes bactériens et de leurs interactions avec les cycles redox du fer et du soufre, toujours actifs dans les strates externes de la couche composite « rouille/micro-organismes », tendrait peut-être à s'amoindrir. Il serait alors intéressant de voir, sur des échantillons un peu plus anciens, si la phase $\beta\text{-Fe}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ majoritairement observée sur les lingots gallo-romains des Saintes-Maries de la Mer [6], pourrait être détectée sur des objets contemporains.

En conclusion les principales perspectives ouvertes par ce travail peuvent être

résumées comme suit :

- Le mécanisme général de la corrosion marine des aciers, qui a pu être précisé, présente deux périodes de transition, qu'il va falloir étudier plus en détail, en combinant nécessairement analyses physico-chimiques, électrochimie et techniques de biologie moléculaire.

- La première période de transition (entre ~1 mois et ~1 an d'immersion), déjà connue, concerne le passage d'une interface initialement aérée à une interface essentiellement anoxique. C'est dans cette période que des hétérogénéités, où les BSR se développent précocement, apparaissent. L'objectif sera d'identifier les causes éventuelles d'une amplification de ces hétérogénéités susceptible de conduire à une importante corrosion localisée. Il est fort probable que ces causes soient liées à des associations de bactéries et notamment celles dont les métabolismes touchent aux cycles redox du fer et du soufre.

- La seconde période de transition (> 10 ans) semble correspondre au retour vers des processus peu ou pas influencés par les micro-organismes sulfurogènes. Il est également possible que cette période de transition soit caractérisée par le développement d'hétérogénéités pouvant conduire à des couplages galvaniques entre des zones anodiques et cathodiques. L'apparition de phases chlorurées telles que $\beta\text{-Fe}_2(\text{OH})_3\text{Cl}$ pourrait être caractéristique de ces processus se déclenchant à l'issue de longues durées d'immersion.

Références :

- [1] S. Pineau, *Interactions entre les communautés bactériennes et les processus de corrosion accélérée des structures métalliques en environnement marin*, Thèse, Université de Technologie de Compiègne (2006).
- [2] S. Pineau, R. Sabot, L. Quillet, M. Jeannin, Ch. Caplat, I. Dupont-Morrall, Ph. Refait, *Formation of the Fe(II-III) hydroxysulphate green rust during marine corrosion of steel associated to molecular detection of dissimilatory sulphite-reductase*, Corros. Sci. **50** (2008) p. 1099-1111.
- [3] A. Zegeye, *Formation et stabilité des hydroxysels Fe(II-III) de type rouille verte en cultures bactériennes*, Thèse, Université Henri Poincaré - Nancy 1 (2006).
- [4] A. Zegeye, L. Huguet, M. Abdelmoula, C. Carteret, M. Mullet, F. Jorand, *Biogenic hydroxysulfate green rust, a potential electron donor for SRB activity*, Geochim. Cosmochim. Acta **71** (2007) 5450-5462.
- [5] R. E. Melchers, R. Jeffrey, *Early corrosion of mild steel in seawater*, Corros. Sci. **47** (2005) p. 1678-1693.

[6] C. Rémazeilles, D. Neff, F. Kergourlay, E. Foy, E. Conforto, E. Guilminot, S. Reguer, Ph. Refait, Ph. Dillmann, *Mechanisms of long-term anaerobic corrosion of iron archaeological artefacts in seawater*, Corros. Sci. **51** (2009) p. 2932-2941.

Annexe

Protocoles de biologie moléculaire

Protocole du kit Nucleospin

NucleoSpin® Tissue

5 Protocols

5.1 Standard protocol for human or animal tissue and cultured cells

Before starting with the preparation, set incubators or water baths to 56°C and 70°C, respectively. Before elution, equilibrate Elution Buffer BE to 70°C.

1 Prepare sample

Tissue

Cut **25 mg** human or animal **tissue** into small pieces. Place the sample in a microcentrifuge tube. Proceed with step 2.

Cultured cells

Resuspend up to **10⁷ cells** in a final volume of **200 µl Buffer T1**. Add **25 µl Proteinase K solution** and **200 µl Buffer B3**. Incubate the sample at 70°C for 10-15 min. Proceed with step 4.

Samples that are difficult to lyse can be ground under liquid nitrogen or may be treated in a mechanical homogenizer (Polytron, Ultra Turax): Add 25 mg of tissue to a 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), add 50-75 µl phosphate buffered saline (PBS) and homogenize.

2 Pre-Lysis

Add **180 µl Buffer T1** and **25 µl Proteinase K solution**. Vortex to mix. Be sure that the samples are completely covered with lysis solution.

If processing several samples, Proteinase K and Buffer T1 may be premixed directly before use. Do never mix Buffer T1 and Proteinase K more than 10-15 min before addition to the sample: Proteinase K tends to self-digestion in Buffer T1 without substrate.



+ 180 µl T1
+ 25 µl
Proteinase K

NucleoSpin® Tissue

Incubate at **56°C** until complete lysis is obtained (at least 1-3 h). Vortex occasionally during incubation or use a shaking incubator.

Samples can be incubated overnight as well. If RNA-free DNA is crucial for downstream applications, an RNase digest may be performed: Add 20 µl RNase A (20 mg/ml) solution (not included; see ordering information) and incubate for an additional 5 min at room temperature.

3 Lysis

Vortex the samples. Add **200 µl Buffer B3**, vortex vigorously and incubate at **70°C** for **10 min**. Vortex briefly.

If insoluble particles are visible, centrifuge for 5 min at high speed (e.g. 11,000 x g) and transfer the supernatant to a new microcentrifuge tube (not provided).



+ 200 µl B3
70°C
10 min

4 Adjust DNA binding conditions

Add **210 µl ethanol** (96-100%) to the sample and vortex vigorously.

After addition of ethanol a stringy precipitate may become visible. This will not affect the DNA isolation. Be sure to load all of the precipitate on the column in the following step.



+ 210 µl
ethanol

5 Bind DNA

For each sample, place one **NucleoSpin® Tissue Column** into a Collection Tube. Apply the sample to the column. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard the flow-through and place the column back into the Collection Tube.

If the sample is not drawn completely through the matrix, repeat the centrifugation step at 11,000 x g. Discard flow-through.



load samples
1 min
11,000 x g

Protocole du kit PowerSoil DNA Isolation



Experienced User Protocol

Please wear gloves at all times

1. To the PowerBead Tubes provided, add 0.25 gm of soil sample.
2. Gently vortex to mix.
3. **Check Solution C1.** If Solution C1 is precipitated, heat solution to 60°C until dissolved before use.
4. Add 60µl of Solution C1 and invert several times or vortex briefly.
5. Secure PowerBead Tubes horizontally using the MO BIO Vortex Adapter tube holder for the vortex (MO BIO Catalog No. 13000-V1) or secure tubes horizontally on a flat-bed vortex pad with tape. Vortex at maximum speed for 10 minutes.
6. Make sure the PowerBead Tubes rotate freely in your centrifuge without rubbing. Centrifuge tubes at 10,000 x *g* for 30 seconds at room temperature. **CAUTION:** Be sure not to exceed 10,000 x *g* or tubes may break.
7. Transfer the supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).
Note: Expect between 400 to 500µl of supernatant. Supernatant may still contain some soil particles.
8. Add 250µl of Solution C2 and vortex for 5 seconds. Incubate at 4°C for 5 minutes.
9. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x *g*.
10. Avoiding the pellet, transfer up to, but no more than, 600µl of supernatant to a clean 2 ml Collection Tube (provided).
11. Add 200µl of Solution C3 and vortex briefly. Incubate at 4°C for 5 minutes.
12. Centrifuge the tubes at room temperature for 1 minute at 10,000 x *g*.
13. Avoiding the pellet, transfer up to, but no more than, 750µl of supernatant into a clean 2 ml Collection Tube (provided).
14. Add 1200µl of Solution C4 to the supernatant and vortex for 5 seconds.
15. Load approximately 675µl onto a Spin Filter and centrifuge at 10,000 x *g* for 1 minute at room temperature. Discard the flow through and add an additional 675µl of supernatant to the Spin Filter and centrifuge at 10,000 x *g* for 1 minute at room temperature. Load the remaining supernatant onto the Spin Filter and centrifuge at 10,000 x *g* for 1 minute at room temperature. **Note:** A total of three loads for each sample processed are required.
16. Add 500µl of Solution C5 and centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x *g*.
17. Discard the flow through.
18. Centrifuge again at room temperature for 1 minute at 10,000 x *g*.
19. Carefully place Spin Filter in a clean 2 ml Collection Tube (provided). Avoid splashing any Solution C5 onto the Spin Filter.
20. Add 100µl of Solution C6 to the center of the white filter membrane. Alternatively, sterile DNA-Free PCR Grade Water may be used for elution from the silica Spin Filter membrane at this step (MO BIO Catalog No. 17000-10).
21. Centrifuge at room temperature for 30 seconds at 10,000 x *g*.
22. Discard the Spin Filter. The DNA in the tube is now ready for any downstream application. No further steps are required.

We recommend storing DNA frozen (-20° to -80°C). Solution C6 contains no EDTA. To concentrate the DNA see the Additional Information Section.

Thank you for choosing the PowerSoil™ DNA Isolation Kit.

Technical Information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 Email: technical@mobio.com

Protocole du kit PowerMax Soil DNA Isolation



Experienced User Protocol

Please wear gloves at all times

1. Add 15 ml of PowerBead Solution to a PowerBead Tube. **These tubes will now be referred to as PowerMax™ Bead Solution Tubes.**
2. Add up to 10 g of soil sample to PowerMax™ Bead Solution Tube. Vortex vigorously for 1 minute.
Note: Please refer to Additional Information Section before deciding on the amount of soil to process.
3. **Check Solution C1.** If Solution C1 is precipitated, heat the solution at 60°C until the precipitate has dissolved. Add 1.2 ml of Solution C1 to the PowerMax™ Bead Solution Tube and vortex vigorously for 30 seconds.
4. Place PowerMax™ Bead Solution Tubes on the MO BIO Laboratories, Inc. Vortex Adapter and vortex for 10 minutes at the highest speed. *Alternatively, you can place the tubes in a shaking water bath set at 65°C and shake at maximum speed for 30 minutes.*
5. Centrifuge tubes at 2500 x g for 3 minutes at room temperature.
6. Transfer supernatant to a clean Collection Tube (provided). The supernatant may still contain some soil particles and color.
7. Add 5 ml of Solution C2 and invert twice to mix. Incubate at 4°C for 10 minutes.
8. Centrifuge tubes at 2500 x g for 4 minutes at room temperature.
9. Avoiding pellet, transfer supernatant to a clean Collection Tube (provided).
10. Add 4 ml of Solution C3 and invert twice to mix. Incubate at 4°C for 10 minutes.
11. Centrifuge tubes at 2500 x g for 4 minutes at room temperature.
12. Avoiding pellet, transfer supernatant to a clean Collection Tube (provided).
13. Add 30 ml of Solution C4 to supernatant and invert twice.
14. This step requires three centrifugations. First, fill Spin Filter with solution from Step 13. Centrifuge at 2500 x g for 2 minutes at room temperature. Discard flow through and add second volume of supernatant to same Spin Filter and centrifuge at 2500 x g for 2 minutes at room temperature. Discard flow through. Repeat until entire volume has been processed.
15. Add 10 ml of Solution C5 to Spin Filter and centrifuge at 2500 x g for 3 minutes at room temperature. Discard flow through.
16. Centrifuge Spin Filter at 2500 x g for 5 minutes at room temperature.
17. Carefully place Spin Filter in a new Collection Tube (provided). Avoid splashing Solution C5 onto Spin Filter.

Technical information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 email: technical@mobio.com



18. Add 5 ml of sterile Solution C6 to the center of Spin Filter membrane and centrifuge at 2500 x g for 3 minutes at room temperature.
19. Discard Spin Filter. The DNA in the tube is now ready for any downstream application. No further steps are required.

We recommend storing DNA frozen (-20°C). Solution C6 does not contain EDTA. To concentrate DNA see the Additional Information Section.

Thank you for choosing the PowerMax™ Soil DNA Isolation Kit.

Technical information: Toll free 1-800-606-6246, or 1-760-929-9911 email: technical@mobio.com

Protocole du kit NucleoSpin Plasmid

NucleoSpin® Plasmid

NucleoSpin® Plasmid

5 Protocols for plasmid DNA preparation

5.1 Standard protocol: Isolation of plasmid DNA from *E. coli* with NucleoSpin® Plasmid

1 Cultivate and harvest bacterial cells

Using **1–5 ml** of a saturated *E. coli* **LB culture**, pellet cells in a standard benchtop microcentrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard the supernatant.

Remove as much of the supernatant as possible. The binding capacity of the silica membrane for plasmid DNA (60 µg) allows processing of even larger culture volumes of up to 10 ml. However, depending on the cells used, the membrane may clog when using volumes > 5 ml.



30 s
11,000 x g

2 Cell lysis

Add **250 µl buffer A1**. Resuspend the cell pellet by vigorous vortexing.

No cell clumps should remain in the suspension before the addition of buffer A2.

Add **250 µl buffer A2**. Mix gently by inverting the tube **6–8 times**. Do not vortex. Incubate at **room temperature** for a maximum of **5 min**.

At least when using less than 3 ml of bacterial culture the cell suspension should become clear as cell lysis occurs. Do not vortex: chromosomal DNA might be released by mechanical shearing.

Add **300 µl buffer A3**. Mix gently by inverting the tube **6–8 times**. Do not vortex.



+ 250 µl A2
mix

+ 300 µl A3
mix

3 Clarification of lysate

Centrifuge for **5 - 10 min** at **11,000 x g** at room temperature.

Depending on culture volume and medium, centrifugation time can vary from 5 – 10 min (see section 2.3).



5 - 10 min
11,000 x g

4 Bind DNA

Place a NucleoSpin® Plasmid column in a 2 ml collecting tube and load the supernatant from step 3 onto the column. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard flow-through.



load
supernatant

1 min
11,000 x g

5 Wash silica membrane

Place the NucleoSpin® Plasmid column back into the 2 ml collecting tube and add **600 µl buffer A4** (with ethanol, see section 3). Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard flow-through.



+ 600 µl A4

1 min
11,000 x g

If plasmid DNA is prepared from host strains containing high levels of nucleases (e.g. HB101 or strains of the JM series), it is strongly recommended to perform an additional washing step with **500 µl prewarmed buffer AW (50 °C)** and a centrifugation step (1 min; 11,000 x g) before proceeding with washing buffer A4. Additional washing with buffer AW will also increase the reading length of DNA sequencing reactions and improve the performance of critical enzymatic reactions.

6 Dry silica membrane

To dry the silica membrane completely, reinsert the NucleoSpin® Plasmid column into the 2 ml collecting tube. Centrifuge for **2 min** at **11,000 x g**.

Residual ethanol/washing buffer, which might inhibit enzymatic reactions, is removed by this centrifugation step completely.



2 min
11,000 x g

7 Elute highly pure DNA

Place the NucleoSpin® Plasmid column in a 1.5 ml microcentrifuge tube and add **50 µl buffer AE**. Incubate **1 min** at **room temperature**. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.

By repeating this step, the overall yield will increase by 15–20 % (also see section 2.7). Elution can be done with TE buffer or water as well. However, we recommend the use of a weakly buffered, slightly alkaline buffer containing no EDTA, especially if the plasmid DNA is intended for sequencing reactions. If water is used, the pH should be checked and adjusted to pH 8–8.5; absorption of CO₂ leads to a decrease in pH of unbuffered solutions.



+ 50 µl AE
1 min
11,000 x g

12

MACHEREY-NAGEL – 07/2003/ Rev 01

MACHEREY-NAGEL – 07/2003/ Rev 01

13

Résumé. Le but de ce travail était de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la corrosion marine des structures en acier. Ces mécanismes impliquant l'influence de micro-organismes vivants, et notamment des bactéries sulfurogènes, l'étude a couplé des méthodes physico-chimiques à des techniques de microbiologie et de biologie moléculaire. Dans un premier temps, un système modèle de laboratoire a été élaboré afin d'étudier en détail les interactions entre les bactéries sulfato-réductrices (BSR) et le principal produit de la corrosion électrochimique des aciers en milieu marin, à savoir la rouille verte sulfatée $RV(SO_4^{2-})$. Nous avons ainsi pu reproduire une partie des mécanismes mis en jeu, en montrant que les BSR pouvaient se développer en consommant les ions SO_4^{2-} issus de la rouille verte et générer ainsi la mackinawite FeS observée sur sites. Dans un deuxième temps, l'évolution de la couche composite « rouille/biofilm » se formant sur acier en milieu marin a été suivie pour des temps courts d'immersion, allant de 1 semaine à deux mois. Le suivi simultané des données microbiologiques et physicochimiques a permis de montrer que l'influence des BSR ne se faisait pratiquement pas sentir à ce stade. Cependant, le développement préférentiel de bactéries associées au fer et au soufre au sein de la couche de rouille a pu être mis en évidence. Par ailleurs, très localement, le processus influencé par les BSR a été détecté. Enfin, une étude électrochimique en solutions désaérées simulant l'eau de mer a été confrontée aux résultats de l'analyse physico-chimique et microbiologique d'un coupon immergé 11 ans en milieu portuaire. L'ensemble des résultats montrent que $RV(SO_4^{2-})$ se forme également lorsque des conditions anoxiques sont établies à la surface du métal. La formation de $RV(SO_4^{2-})$ entre cependant en compétition avec celle de FeS et Fe_3O_4 suite aux modifications du milieu que peuvent engendrer les micro-organismes. A ces temps d'immersion long, l'influence des bactéries semblent néanmoins s'amoindrir, les micro-organismes tendant à s'éloigner des strates internes de la couche de rouille et donc du métal pour coloniser des zones externes plus riches en substances nutritives.

Abstract. The aim of this study was to understand the mechanisms involved in marine corrosion of steel structures. These mechanisms are known to be influenced by micro-organisms, in particular by the sulphide-producing bacteria. It was then necessary to couple physico-chemical investigations with techniques of microbiology and molecular biology. In the first part of this work, a laboratory model was designed so as to study the interactions between sulphate-reducing bacteria (SRB) and the main product of the electrochemical corrosion process of iron in seawater, the sulphated green rust, $GR(SO_4^{2-})$. We demonstrated that SRB could grow using only the SO_4^{2-} ions coming from the green rust, thus generating mackinawite FeS as observed in real marine corrosion cases. In the second part, the evolution of the "rust/biofilm" layer that forms on steel in natural seawater was followed for short immersion times, from 1 week to 2 months. The simultaneous monitoring of microbiological and physico-chemical data showed that the influence of SRB was negligible at those early stages. However, the preferential growth of bacteria associated with iron and sulphur could be detected. Moreover, the process influenced by SRB could be detected locally in one case. Finally, in the third part of this work, an electrochemical study of carbon steel in deaerated seawater-like solutions was compared to the results of the physico-chemical and microbiological characterisation of a steel coupon left 11 years in a harbour site. All the results showed that $GR(SO_4^{2-})$ was also forming when anoxic conditions were met at the steel surface. The formation of $GR(SO_4^{2-})$ however competes with that of FeS and Fe_3O_4 due to the modifications of the environment induced by micro-organisms. For such long immersion periods, the influence of bacteria seems to decrease. The micro-organisms tend to move away from the inner parts of the rust layer, and then from the metal, to settle the outer parts where more nutrients are available.